



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Unidad de Posgrado

**Desarrollo de un inmunoensayo basado en nanopartículas para el
diagnóstico de neurocisticercosis humana**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular

AUTOR

Luz Agueda PÉREZ TOMA

ASESOR

Mg. Gustavo Adolfo SANDOVAL PEÑA

Dr. Yagahira Elizabeth CASTRO SESQUEN (Coasesor)

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Pérez, N. (2020). *Desarrollo de un inmunoensayo basado en nanopartículas para el diagnóstico de neurocisticercosis humana*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	https://orcid.org/0000-0002-7355-806X
DNI o pasaporte del autor	44768260
Código ORCID del asesor	https://orcid.org/0000-0002-8392-9880
DNI o pasaporte del asesor	41020762
Grupo de investigación	-
Agencia financiadora	Perú, Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONDECYT-CIENCIA ACTIVA) 115-2015-FONDECYT-DE
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	<p>Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres, Lima, Perú. 12.023998376576996, - 77.05645884575543</p> <p>Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici ICN2 Campus de la, Av. de Serragalliners, s/n, 08193 Bellaterra, España. 41.501241093887266, 2.1117534421683115</p>
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2 años y 8 meses
Disciplinas OCDE	<p>Bioquímica y Biología Molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Inmunología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.03</p>



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 196v-UPG-FCB-2020

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR (SUSTENTACIÓN VIRTUAL)**

Siendo las 13:00 horas del día 27 de agosto de 2020 en el Evento Virtual mediante la herramienta MEET de Google, con enlace meet.google.com/fiw-wzvn-orz, el Jurado de Tesis conformado por:

Dr.	Armando Yarleque Chocas	(Presidente)
Dr.	Armando Emiliano González Zariquey	(Miembro)
Dr.	Juan Atilio Jiménez Chunga	(Miembro)
Mg.	Gustavo Adolfo Sandoval Peña	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara la Bachiller Doña **LUZ AGUEDA PÉREZ TOMA**.

Después de darse lectura al Expediente N° 196v-UPG-FCB-20, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado presenciaron la exposición de la Tesis Titulada:

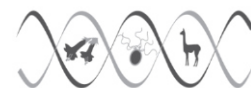
“DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO BASADO EN NANOPARTÍCULAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS HUMANA”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VICEDECANATO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: .Muy bueno con la nota de 17

A continuación, el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magister en Biología Molecular a la Bachiller **LUZ AGUEDA PÉREZ TOMA**.

Siendo las 14:40 se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día jueves 27 del mes de agosto del año 2020.

.....
Dr. Armando Yarleque Chocas

Profesor Principal a T.C.

PRESIDENTE

ayarlequec@unmsm.edu.pe

RENACYT P0000073

.....
Mg. Gustavo A. Sandoval Peña

Profesor Asociado T.C.

ASESOR

gsandovalp@unmsm.edu.pe

RENACYT P0001316

.....
Dr. Armando E. González Zariquiey

Profesor Principal a D.E.

MIEMBRO

agonzalez@unmsm.edu.pe

RENACYT P0000072

.....
Dr. Juan A. Jiménez Chunga

Profesor Principal a D.E.

MIEMBRO

jjimenezc@unmsm.edu.pe

RENACYT P0013740

AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primer lugar a Dios por la oportunidad de conocer a las personas que de alguna u otra forma fueron parte de este trabajo.

Al Laboratorio en Inmunología Parasitaria de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por abrirme las puertas. Al Dr. Hugo García, por depositar su confianza en el desarrollo de la tesis. A la Dra. Yagahira Brown y Dr. Javier Palomino por el asesoramiento en la redacción, desarrollo y culminación de la tesis. A la Mg. Yesenia Castillo, por el entrenamiento en el uso y cuidado de los equipos. A Luz Toribio, Cindy Espinoza, Yesica Santos, Kevin Martel por la ayuda en la parte técnica de la tesis.

Al grupo Nanobioelectronic and Biosensors del Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology de la Universidad Autónoma de Barcelona, España, por abrirme las puertas de sus laboratorios para la culminación de la tesis de maestría. Al Dr. Arben Merkoci, por depositar su confianza en la culminación del estudio. Al Dr. Alfredo de la Escosura por el asesoramiento en el desarrollo de los experimentos. Al Dr. Daniel Quesada, por el entrenamiento en el manejo de nuevas técnicas y ayuda en los análisis de resultados.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONDECYT-CIENCIA ACTIVA) [115-2015-FONDECYT-DE] y el NIH/Fogarty Training Grant [TW001140] por el financiamiento concedido en el desarrollo y culminación de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi padre celestial por sus bendiciones.

A mis padres Elías y Antonia por sus oraciones.

A mis hermanos Ruth y Cesar por su apoyo emocional.

A mi esposo Wilfredo por ser un motor para alcanzar
mis metas.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	6
3.1. Hipótesis.....	6
3.2. Objetivos	6
4. MATERIALES.....	7
4.1. Material de laboratorio	7
4.2. Material biológico.....	8
5. METODOLOGÍA.....	9
5.1. Purificación de anticuerpos monoclonales IgM a partir de sobrenadante de	9
cultivo celular	9
5.2. Síntesis de nanopartículas de oro a través de la reducción de citrato	13
5.3. Adsorción del anticuerpo mIgM a la NpAu	14
5.4. Validación de la prueba rápida en orina humana.....	16
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1. Purificación de anticuerpos monoclonales IgM a partir de sobrenadante de	22
cultivo celular	22
6.2. Síntesis de nanopartículas de oro	29
6.3. Adsorción del anticuerpo monoclonal IgM en la NpAu	31
6.4. Validación de la prueba rápida en muestras de orina	38
6.5. Resultados adicionales.....	49
7. CONCLUSIONES	54
8. RECOMENDACIONES	55
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

RESUMEN

La neurocisticercosis es una infección parasitaria del sistema nervioso y es considerada una de las principales causas de epilepsia en el Perú. Las pruebas serológicas constituyen una herramienta sensible en el diagnóstico complementario de la enfermedad. Sin embargo, la mayoría emplea muestras invasivas, su procedimiento demanda tiempo, y no es adecuado en la implementación de laboratorios con poca instrumentación. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una prueba rápida basada en nanopartículas de oro y anticuerpos monoclonales que se pueda emplear en muestras de orina. En la purificación de anticuerpos IgM a partir de sobrenadante de cultivo celular se empleó partículas magnéticas de 0.5 μm acopladas covalentemente a proteína L recombinante, y se obtuvo IgM puros con un rendimiento >93%. Se sintetizaron nanopartículas de oro de ~17 nm mediante la reducción de citrato. La prueba rápida estuvo en formato lateral flow con dimensiones 6 cm x 30 cm. La curva de calibración del antígeno somático de *T. solium* en orina humana fue logarítmica en un rango de 20 a 500 ng/ml, y el límite de detección fue 2.87 ng/ml. La sensibilidad y especificidad de la prueba fue 84.64% y 100% respectivamente en pacientes con 2 a más quistes. La alta sensibilidad, su fácil elaboración, el uso amigable y la rápida detección convierten a la prueba rápida en un prototipo de diagnóstico que podría ser empleado en el seguimiento de pacientes con tratamiento y estudios epidemiológicos de zonas donde no se cuenten con laboratorios altamente equipados.

Palabras claves: neurocisticercosis, partículas magnéticas, anticuerpos IgM, nanopartículas de oro, prueba rápida.

ABSTRACT

Neurocysticercosis is a parasitic infection of the nervous system and is considered one of the main causes of epilepsy in the Peru. Serological tests are a sensitive tool in the complementary diagnosis of the disease. However, most employ invasive samples, their procedure takes time, and is not adequate in the implementation of laboratories with little instrumentation. The objective of this project was to develop a rapid test based on gold nanoparticles and monoclonal antibodies that can be used in urine samples. In the purification of IgM antibodies from cell culture supernatant, 0.5 μ m magnetic particles covalently coupled to recombinant L protein were used, and pure IgM was obtained with a yield > 93%. Gold nanoparticles \sim 17 nm were synthesized by citrate reduction. The rapid test was in lateral flow format with dimensions 6 cm x 30 cm. The calibration curve of the *T. solium* somatic antigen in human urine was logarithmic in a range of 20 to 500 ng/ml, the detection limit was 2.87 ng/ml. The sensitivity and specificity of the test was 84.64% and 100% respectively, in patients with 2 or more cysts. The high sensitivity, its easy elaboration, the friendly use and the rapid detection make the rapid test a diagnostic prototype to be used in the follow-up of patients with treatment and epidemiological studies of areas where there are no highly equipped laboratories.

Keywords: neurocysticercosis, magnetic particles, IgM antibodies, gold nanoparticles, rapid test.

LISTA DE ABREVIATURAS

NCC	Neurocisticercosis
TC	Tomografía Computarizada
IRM	Imagen de Resonancia Magnética
EITB	(siglas en inglés) Inmuno ElectroTransferencia Blot
ELISA	(siglas en inglés) Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ASSURED	(siglas en inglés) prueba Asequible, Sensible, Específico, uso Amigable, Rápido y Robusto
IFL	Inmunoensayo de Flujo Rápido
LF	Lateral Flow
NpAu	Nanopartícula de Oro
LAT	(siglas en inglés) Prueba de Aglutinación en Látex
ICA	(siglas en inglés) Ensayo de Inmunocromatografía
SCC	Sobrenadante de Cultivo Celular
mIgM	Anticuerpo monoclonal IgM
PR	Porcentaje de Recuperación
PM	Partículas Magnéticas
PL	Proteína L
DO	Densidad Óptica
SDS-PAGE	(siglas en inglés) Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TEM	(siglas en inglés) Microscopio Electrónico de Transmisión
RPS	(Resonancia del plasmón de la superficie)
LOD	(siglas en inglés) Límite de Detección

LOQ	(siglas en inglés) Límite de Cuantificación
LIEI	Laboratorios de Investigación en Enfermedades Infecciosas
UPCH	Universidad Peruana Cayetano Heredia
ICN	Instituto de Ciencias Neurológicas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de purificación de anticuerpos monoclonales IgM a partir de sobrenadante de cultivo celular, mediante el uso de partículas magnéticas unidas a proteína L.

Figura 2. Adsorción del anticuerpo monoclonal IgM a la NpAu, a través de la interacción con el citrato en la superficie de la partícula.

Figura 3. Pico de resonancia de superficie plasmónica en nanopartículas de oro con tamaños de 5-100 nm. Figura adquirida de Hu M et al., 2006.

Figura 4. Ensamblaje de una prueba rápida.

Figura 5. Migración de la NpAu/mIgM a través de la membrana de nitrocelulosa.

Figura 6. Tinción con azul de Coomassie después del SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio) al 10% de los anticuerpos monoclonales IgM (TsW8 y TsW5) antes y después de la purificación con partículas magnéticas acopladas a proteína L.

Figura 7. Espectro de absorción de las NpAu a 520 nm, por espectrometría de UVvisible con rangos de 400 a 600 nm e intervalos de 10 nm.

Figura 8. Observación de la forma esférica y tamaño de la NpAu a través del microscopio electrónico de transmisión.

Figura 9. Evaluación de la estabilidad de NpAu por espectrometría de UV-visible con rangos de 350 a 750 nm e intervalos de 10 nm.

Figura 10. Punto de saturación respecto a la concentración de mIgM sobre la NpAu.

Figura 11. Efecto de la concentración del anticuerpo monoclonal IgM en la adsorción a NpAu medido por espectrometría de UV-visible con rangos de 400 a 600 nm e intervalos de 10 nm.

Figura 12. Gráfico de la saturación de la superficie de NpAu con anticuerpo monoclonal IgM.

Figura 13. Efecto del pH en la adsorción del anticuerpo monoclonal IgM a la NpAu medido por espectrometría de UV-visible con rangos de 400 a 600 nm e intervalos de 10 nm.

Figura 14. Curva de calibración del antígeno somático desde 0 a 500 ng/ml en pool de orina de personas sanas (n=5).

Figura 15. Curva de calibración en orina humana utilizando la prueba rápida.

Figura 16. Curva de calibración en orina humana utilizando el ensayo de ELISA.

Figura 17. Curva de dilución del pool de orina humana de pacientes con neurocisticercosis usando la prueba rápida.

Figura 18. Curva de dilución del pool de orina humana de pacientes con neurocisticercosis usando el ensayo de ELISA.

Figura 19. Curva ROC. Evaluación de la prueba rápida en pacientes que presentan 2 a más quistes. Los datos de confirmación de pacientes que presentan 2 a más quistes fueron proporcionados por la Unidad de Cisticercosis del Instituto Nacional De Ciencias Neurológicas - Hospital Santo Toribio de Mogrovejo.

Figura 20. Curva ROC. Evaluación del ensayo de ELISA en pacientes que presentan 2 a más quistes. Los datos de confirmación de pacientes que presentan 2 a más quistes fueron proporcionados por la Unidad de Cisticercosis del Instituto Nacional De Ciencias Neurológicas - Hospital Santo Toribio de Mogrovejo.

Figura 21. Curva ROC. Evaluación de la prueba rápida en pacientes con NCC subaracnoidea. Los datos de confirmación de pacientes con NCC subaracnoidea fueron proporcionados por la Unidad de Cisticercosis del Instituto Nacional De Ciencias Neurológicas - Hospital Santo Toribio de Mogrovejo.

Figura 22. Curva ROC. Evaluación del ensayo de ELISA en pacientes con NCC subaracnoidea. Los datos de confirmación de pacientes con NCC subaracnoidea fueron proporcionados por la Unidad de Cisticercosis del Instituto Nacional De Ciencias Neurológicas - Hospital Santo Toribio de Mogrovejo.

Figura 23. Comparación entre el uso de anticuerpos IgM e IgG en ensayos de prueba rápida.

Figura 24. Control de calidad del anticuerpo IgM fragmentado por cromatografía de exclusión molecular y SDS PAGE TGX.

Figura 25. Constante de asociación del anticuerpo IgM y fragmentos de IgMs.

Figura 26. Límite de detección del anticuerpo IgM y fragmento de IgMs.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo de optimización para la purificación de mIgM a partir de SCC utilizando PM.

Tabla 2. Numero de usos de las partículas magnéticas en la purificación de anticuerpos monoclonal IgM.

Tabla 3. Concentración de mlgM vs diámetro hidrodinámico y carga superficial de la NpAu.

Tabla 4. Área bajo la curva ROC. Evaluación de la prueba rápida comparado con el ensayo de ELISA en pacientes con NCC que presentan 2 a más quistes.

Tabla 5. Área bajo la curva ROC. Evaluación de la prueba rápida comparado con el ensayo de ELISA en pacientes con NCC subaracnoidea.

1. INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis (NCC) es una infección parasitaria del sistema nervioso central causado por la invasión del estadio larval de *Taenia solium* (García *et al.*, 2005; Del Brutto *et al.*, 2013), y es considerada una de las principales causas de epilepsia en el Perú y en la mayoría de países en desarrollo (Dimubanzi *et al.*, 2010). El diagnóstico suele ser complicado debido al tamaño, localización y número variable de lesiones en el sistema nervioso central. (Del Brutto *et al.*, 2005). Las técnicas de imagen, tal como; escáner de tomografía computarizada-TC e imagen de resonancia magnética-IRM permiten la visualización e identificación del parásito en el cerebro. (García *et al.*, 1994; García *et al.*, 2001; García *et al.*, 2003; García *et al.*, 2014). Sin embargo, dicha técnica resulta ser de alto costo e inaccesible en zonas endémicas.

Las pruebas serológicas Inmunoelctrotransferencia blot o Western blot o EITB y el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas o ELISA constituyen un complemento primario en el diagnóstico definitivo de la NCC, ya que ayuda en la confirmación de la etiología, además provee un filtro en la selección de pacientes con alta probabilidad de desarrollar la enfermedad, o para enfocar en actividades de control. (García *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2012). El Western blot tiene una sensibilidad alrededor del 98%, y es usado para la detección de anticuerpos contra *T. solium* en suero o líquido cefalorraquídeo (LCR) (Rodríguez *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2012; García *et al.*, 2014; Proaño-Narvaez *et al.*, 2002). Se ha reportado con frecuencia anticuerpos en la población asintomática de regiones endémicas. Lo que sugiere que los anticuerpos pueden persistir bastante tiempo en circulación, aun después de que el parásito haya sido eliminado. Por lo que, su presencia puede indicar solo exposición al parásito y no necesariamente un indicador de infección viable. Por el contrario, se ha reportado que la detección de antígeno circulante en pacientes con parásitos vivos en el cerebro, indica infección activa (Parija *et al.*, 2004; García *et al.*, 2014). Los antígenos pueden ser detectados mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos (Zamora *et al.*, 2005; Fleury *et al.*, 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere que el diagnóstico del futuro debería ser definido como ASSURED, siglas en inglés: asequible, sensible, específico, de uso amigable, rápido y robusto (Peeling *et al.*, 2006). Sin embargo, una limitante de las pruebas serológicas es la colección de sangre o LCR, lo que le convierte en un procedimiento invasivo (Parija *et al.*, 2004), además cuentan con formatos que consumen tiempo, debido a la necesidad de múltiples pasos, como la adición de reactivos, lavados, tiempos de incubación, y no resulta ser adecuado si se desea emplear en estudios de investigación epidemiológica o en la implementación de laboratorios clínicos en zonas con poca instrumentación. Un excelente ejemplo de un dispositivo ASSURED, son las pruebas rápidas, tal como; el Inmunoensayo de Flujo Lateral (IFL) o Lateral Flow (LF) (Costa *et al.*, 2014). El principio de un LF es similar al de una prueba inmunocromatográfica, donde la separación de analitos fluye a través de un medio poroso, dando como resultado interacciones específicas entre antígeno-anticuerpo (Parolo *et al.*, 2013; De la Escosura-Muniz *et al.*, 2010). Una pieza clave en el desarrollo de un LF es la síntesis *in house* de nanopartículas de oro (NpAu), debido al manejo de tamaños/biocompatibilidad, (Quesada-Gonzalez D, Merkoci A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2015; 73:47-63), otra pieza clave resulta el uso de moléculas altamente específicas, para obtener no solo una técnica sencilla, sino también robusta.

Los anticuerpos monoclonales están dirigidos contra un solo epítipo, por ende son altamente específicos (Siddiqui *et al.*, 2010). Paredes *et al.*, 2016, caracterizaron 22 anticuerpos monoclonales altamente específicos contra quistes de *T. solium* en ratones BALB/c usando el quiste completo, líquido vesicular y antígeno excretorio/secretorio del cisticerco de *T. solium* como inmunógenos. Mediante un ELISA de captura de antígeno, demostraron que, de los 22 anticuerpos 7 podrían ser candidatos para detectar antígenos en suero y 3 en muestras de orina de pacientes con NCC. El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar una prueba rápida para el diagnóstico de la neurocisticercosis humana, basada en el uso amigable de NpAu y la alta especificidad del anticuerpo monoclonal contra *T. solium*.

2. ANTECEDENTES

Una herramienta básica en el diagnóstico complementario de la NCC humana, son las pruebas serológicas, tal como el ensayo de ELISA y Western blot, estas pruebas detectan antígenos de *T. solium* o anticuerpos contra *T. solium*, lo que indica infección activa o exposición al parásito. El ensayo de ELISA se convierte en una prueba atractiva de monitoreo a largo plazo de pacientes con neurocisticercosis (Fleury *et al.*, 2013). Los antígenos pueden ser detectados mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos (Zamora *et al.*, 2005; Fleury *et al.*, 2013).

Garcia *et al.*, 2000, evaluaron un ensayo de ELISA para la detección del antígeno del parásito en suero humano, mediante el uso de anticuerpos monoclonales. El ensayo mostró una sensibilidad del 85% y una especificidad del 92%. Zea-Vera *et al.*, 2013, desarrollaron un ensayo de ELISA que detecta antígeno de *T. solium* en suero, y demostraron que la presencia de antígenos predice lesiones en el cerebro, que no han sido detectadas en pruebas de neuroimagen. Un ensayo de ELISA podría ser de uso cuando se requiere monitorear el tratamiento anti-parasitario en personas con la enfermedad extendida (Rodríguez *et al.*, 2012; Zamora *et al.*, 2005; Fleury *et al.*, 2013). Estudios recientes monitorearon el nivel de antígeno circulante de *T. solium* semanalmente, y demostraron que pasado los 14 días posteriores al inicio del tratamiento desaparece el antígeno de la sangre (Rodríguez-Hidalgo *et al.*, 2019). Sin embargo, el uso de suero para dichas pruebas lo convierte en un procedimiento invasivo.

Castillo *et al.*, 2009, desarrollaron un ensayo de ELISA en la detección de antígeno secretorio-excretorio de *T. solium* en muestras de orina, mediante el uso de anticuerpos monoclonales. El ensayo muestra una sensibilidad del 85% y una especificidad del 97% para individuos con más de un quiste viable del cisticerco de *T. solium*. Con ello demostraron que el antígeno de cisticerco es excretado en la orina de pacientes infectados. Un ensayo de ELISA puede ser específico y sensible, sin embargo, por el tipo de formato demanda mucho tiempo, requiere instrumentación costosa y personal especializado. Además, si se quiere introducir una prueba para el monitoreo epidemiológico *in situ* de la enfermedad en zonas

endémicas con laboratorios poco equipados, usar este tipo de formato resultaría todo un reto.

La prueba de aglutinación de látex (LAT, siglas en inglés) es una prueba rápida usada comúnmente en laboratorios para determinar de una forma rápida la ausencia o presencia de un antígeno o anticuerpo en una variedad de fluidos corporales, tal como, saliva, orina, fluido cerebroespinal o sangre (UCSF Health). Biswas *et al.*, 2013, desarrolló el ensayo LAT para la detección de antígeno de cisticerco en muestras concentradas de orina de pacientes con neurocisticercosis. El ensayo de LAT mostró una sensibilidad del 58.3% y una especificidad del 94%. Una prueba similar fue realizada por Parija *et al.*, 2004, quienes desarrollaron una prueba rápida de Co-Aglutinación en muestras de orina de pacientes con neurocisticercosis. La prueba detectó antígeno excretado de cisticerco en 55.5% de pacientes diagnosticados con neurocisticercosis, 62.5 % de casos con TC/IRM. No se observó falsos positivos en controles sanos. El ensayo de Co-aglutinación mostró una sensibilidad del 62.5% y especificidad del 100%. La moderada sensibilidad y especificidad del ensayo LAT y Co-Aglutinación, lo convierte en un candidato para uso en laboratorios poco equipados. Sin embargo, resulta un inconveniente la baja sensibilidad en la detección de antígeno de cisticerco, debido a la poca cantidad de antígeno liberado.

Un ensayo de Inmunocromatografía (ICA, siglas en inglés) o más comúnmente denominado IFL es considerado una prueba rápida. En comparación con los métodos analíticos convencionales, como el ensayo de ELISA, tiene muchas ventajas: bajo costo, formato amigable, respuesta al momento, mínima interferencia y facilidad para ser empleado por personal no especializado (Bahadir *et al.*, 2016). El IFL se compone de un sistema cromatográfico (separación de componentes basado en su movimiento a través de la membrana de reacción) y reacción inmunoquímica (Dzantiev *et al.*, 2014). La clave en una prueba rápida es la membrana de nitrocelulosa, ya que proporciona una plataforma para la reacción entre el éster de nitrato de la nitrocelulosa y los enlaces peptídicos del anticuerpo. Cuando la muestra problema se deja caer en la almohadilla de celulosa, el analito

problema fluye por fuerza capilar con dirección al extremo de la tira, donde se da la reacción con el anticuerpo inmovilizado (Bahadir *et al.*, 2016).

El formato de una prueba rápida resulta tentador. Sin embargo, los únicos formatos reportados usando una prueba rápida son empleados en la detección de anticuerpos contra el parásito. Handali *et al.*, 2010, desarrollaron una prueba inmunocromatográfica para la detección de anticuerpos contra *T. solium* en pacientes con teniasis y neurocisticercosis. La prueba estuvo basada en el uso de partículas magnéticas unidas a proteínas recombinantes, rES33 para teniasis y rT24H para neurocisticercosis. La prueba inmunocromatográfica mostró una sensibilidad del 94.5% y una especificidad del 96% en pacientes con teniasis, y una sensibilidad del 93.9% y especificidad del 98.9% en pacientes con neurocisticercosis. Corstjens *et al.*, 2014, desarrollaron una prueba de lateral flow que detecta anticuerpos en muestras de suero de pacientes con neurocisticercosis. El lateral flow estuvo basado en nanopartículas convertidoras de fósforo unidas a proteína A. La prueba mostró una sensibilidad del 96% y una especificidad del 98% respectivamente en paciente con dos o más quistes cerebrales (Corstjens *et al.*, 2014).

Paredes *et al.*, 2016, caracterizaron anticuerpos monoclonales altamente específicos con el producto excretado-secretado de *T. solium*. Mediante el ensayo de ELISA, demostraron que ocho de los 21 anticuerpos monoclonales fueron capaces de detectar antígeno del parásito en suero de pacientes con la enfermedad. En experimento preliminares demostraron que varias combinaciones de los anticuerpos monoclonales podrían usarse para detectar antígenos circulantes en orina de pacientes.

El presente trabajo usa la combinación de dos tipos de anticuerpos monoclonales para desarrollar una prueba rápida tipo inmunoensayo basado en nanopartículas de oro que sirva de formato para estudios epidemiológicos o screening de la enfermedad en zonas endémicas con laboratorios poco equipados y ausencia de personal altamente capacitado.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

El desarrollo de una prueba rápida permitirá introducir un nuevo prototipo de diagnóstico para estudios epidemiológicos en neurocisticercosis humana.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Desarrollar una prueba rápida en orina para el diagnóstico de neurocisticercosis humana usando anticuerpo monoclonal IgM contra el quiste de *T. solium*.

3.2.2. Objetivos específicos

- a. Purificar anticuerpo monoclonal IgM a partir de sobrenadante de cultivo celular de clonas productoras de anticuerpos contra quistes de *T. solium*.
- b. Sintetizar nanopartículas de oro a partir de la reducción con citrato.
- c. Estandarizar la adsorción del anticuerpo monoclonal IgM en nanopartículas de oro.
- d. Validar la prueba rápida en muestras de orina de paciente con neurocisticercosis.

4. MATERIALES

4.1. Material de laboratorio

Para la purificación de los anticuerpos monoclonales se usó: partículas supermagnéticas (Pierce™ Protein L Magnetic Beads, 88849; Thermo Scientific™, USA) y filtro con corte mínimo de 10 kDa (Amicon® Ultra Centrifugal Filters, C7719; Merk Millipore, EE. UU.). Para el control de calidad del anticuerpo purificado se hizo un SDS-PAGE y se usó un Mini-PROTEAN Tetra Cell (1658005EDU; BioRad, EE. UU.). En la cuantificación de los anticuerpos purificados se determinó utilizando el método de Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay, 5000201; BioRad, EE. UU.).

Los reactivos necesarios para la producción de nanopartículas de oro (NpAu) fueron: Acido Tetracloroáurico (Tetrachloroauric (III) acid trihydrate 99%, 1.01582, Sigma, Madrid, España), Citrato de Sodio (Sodium Citrate, PHR1416, Sigma, España). Los reactivos para la estabilización de las NpAu fueron; Tetraborate de sodio (di-Sodium tetraborate decahydrate, 1,01964, Sigma, Madrid, España) y ácido bórico (Boric acid, B6768, Sigma, Madrid, España). En el control de calidad de la producción de NPsAu se utilizó: Microscopio Electrónico de Transmisión, JEM-2010 TEM; Espectrofotómetro de UV-Visible, U-3010; y Zetasizer Nano, ZS90.3433

Los reactivos necesarios para adsorber y estabilizar el anticuerpo en la NPsAu fueron: fosfato de sodio monobásico (Sodium phosphate monobasic monohydrate, S9638; Sigma, Madrid, España), fosfato de sodio dibásico (Sodium phosphate dibasic dihydrate, 71643; Sigma, Madrid, España), sucrosa (Sucrose, 84097; Sigma, Madrid, España).

Los materiales necesarios para ensamblar el prototipo de lateral flow fueron; Membrana de Nitrocelulosa (Hi-Flow Plus 180 Membrane Cards, HF180MC100; Millipore, Billerica, EE. UU.), Fibra de Vidrio (Glass Fiber Conjugate Pads, GFDX 000800; Millipore, Billerica, EE. UU.), Membrana de Celulosa (Cellulose Absorbent

Sample Pads, CFSP0 017 00; Millipore, Billerica, EE. UU.), que sirve como membrana de absorción y membrana para soporte de la muestra. Para el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa se usó BSA (Bovine Serum Albumin, 9048-46-8; Sigma, Madrid, España). Para la dispersión de los anticuerpos en la membrana de nitrocelulosa se usó un Dispensador de reactivo (IsoFlow™ Reagent Dispenser, Hanover, USA). Para obtener tamaños estándares del prototipo se usó una guillotina (Dahle 533, Alemania). Para la lectura cuantitativamente de las tiras de lateral flow se usó un lector de tiras (model ESE Quant Lateral Flow reader; Qiagen Inc., Alemania).

Los equipos permanentes de uso fueron: Agitador (Thermo-Shaker, TS-100, Biosan, Latvia), Espectro de UV-visible (Spectrophotometer, SpectraMx M2^e; Molecular Devices, EE. UU.), sistema Milli-Q ($<18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$; mQ) (Millipore, Suecia). Los reactivos, insumos e instrumentación antes mencionados fueron proporcionado por el Grupo Nanobioelectronics and Biosensors, del Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology, ICN2, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

4.2. Material biológico

El Laboratorio de Neurocisticercosis del LIEI-UPCH (Laboratorios de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú), nos proporcionó sobrenadante de cultivo celular de clonas productoras de anticuerpos monoclonales IgM contra quistes de *T. solium*, también se nos proporcionó antígeno total de cisticerco de *T. solium* para el control de calidad de la purificación de los anticuerpos monoclonales. Para la validación de la prueba rápida, la Unidad de Cisticercosis del Hospital Santo Toribio de Mogrovejo – Instituto de Ciencias Neurológicas, ICN, Lima, Perú, nos proporcionó muestras de orina de pacientes con diagnóstico positivo a neurocisticercosis por neuroimagen y EITB. Para realizar la curva de calibración, el Laboratorio de Inmunología Parasitaria del LIEI-UPCH nos proporcionaron orinas de personas sanas negativas al ensayo de ELISA y EITB.

5. METODOLOGÍA

5.1. Purificación de anticuerpos monoclonales IgM a partir de sobrenadante de cultivo celular

Paredes *et al.*, 2016, caracterizaron 22 anticuerpos monoclonales altamente específicos contra quistes de *T. solium*. Para el presente estudio se nos proporcionó sobrenadante de cultivo celular (SCC) de dos clonas productoras de anticuerpos monoclonales IgM (mIgM), T_sW₈ y T_sW₅. Ambos anticuerpos han sido evaluados en ensayos de ELISA y se ha demostrado que reconocen epítomos distintos del antígeno de *T. solium*.

a. Métodos de concentración para sobrenadante de cultivo celular

Se evaluaron tres métodos de concentración de SCC: filtración por presión (Amicon® Stirred Cells), ultrafiltración pasiva (Minicon® Concentrator) y ultrafiltración por centrifugación (Amicon® Ultra Centrifugal Filters), todos los filtros con corte mínimo de 10 kDa (todas de Merk Millipore, EE. UU.). La concentración de proteínas antes y después de concentrar el SCC se determinó utilizando el método de Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay, 5000201; BioRad, EE. UU.) (Kruger *et al.*, 1994). Se calculó el factor de concentración dividiendo la concentración de proteína del sobrenadante concentrado con la concentración de proteína del sobrenadante inicial. En los tres métodos se evaluó un volumen igual de sobrenadante inicial, dado que la concentración de proteína reflejará principalmente la presencia de albúmina y otras proteínas. Se calculó el porcentaje de recuperación (PR) en términos de actividad de IgM, para ello se utilizó una prueba de ELISA. Se cubrió una placa de ELISA (Costar, Conring, EE. UU) con 500 ng del antígeno de extracto crudo de cisticerco de *T. solium* y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Luego se agregó el anticuerpo mIgM y se incubó 1 hora a 37°C. La unión antígeno-mIgM fue detectado con 500 ng de anticuerpo secundario marcado con biotina (Biotin Labeled Affinity Purified Antibody To Mouse IgM (u), KPL Laboratories, EE. UU.), y se incubó por 1 hora a 37°C. Seguido se agregó

1:2000 de estreptavidina marcado con HRP (Streptavidine-HRP, KPL Laboratories, EE. UU.), y se incubó por 1 hora a 37°C. Finalmente se agregó TMB como sustrato (Sigma, EE. UU.), y se incubó 10 minutos en oscuridad, la solución para parar la reacción se usó ácido sulfúrico 0.5 M (Paredes *et al.*, 2016). La densidad óptica se midió a 590 nm utilizando el SpectraMax-340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.). El PR de mIgM se calculó dividiendo la densidad óptica del sobrenadante concentrado por la densidad óptica del sobrenadante inicial multiplicado por 100.

b. Purificación de anticuerpos IgM

Mediante el uso de partículas supermagnéticas (0.5 μm de radio medio) acopladas covalentemente con proteína L recombinante (Pierce™ Protein L Magnetic Beads, Thermo Scientific, EE. UU.), se purificó mIgM a partir del SCC. La proteína L (peso molecular, ~ 35.8 kDa) interactúa con la región variable de la cadena ligera kappa la cual está expuesta en todos los isotipos de anticuerpos sin interferir con el sitio de unión al antígeno, y ofrece la ventaja de no reaccionar con IgGs de especies bovina y caprina que generalmente están presentes en sobrenadantes de cultivos celulares enriquecidos con suero de estos animales (Paloni *et al.*, 2017; Kruger *et al.*, 1994). Las partículas magnéticas (PM) pueden remplazar los pasos de concentración del SCC, disminuyendo así la manipulación de los anticuerpos. Con el uso de PM la unión del anticuerpo se produce en solución, y no en una superficie estática como las que brinda las columnas de cromatografía, proporcionando así una interacción tridimensional de la IgM con la proteína L (PL). Una ventaja adicional de la PM es la fuerza magnética, ello permite la separación de IgM sin la necesidad de centrifugar o precipitar.

Para determinar el porcentaje de recuperación de mIgM, se incubaron seis volúmenes diferentes (100 μl , 250 μl , 500 μl , 750 μl , 1000 μl , y 1500 μl) de SCC con 400 μg de PM en un volumen total de 1500 μl de solución salina tamponada con Tris (TBS, Tris 25 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4) en agitación constante (500 rpm, LabRoller) por 45 minutos y a temperatura ambiente. Después de la incubación, los complejos de IgM+PM se separaron usando un soporte magnético durante un minuto. La elución de las IgMs a partir de la PM se realizó utilizando glicina 2M, pH

2 a temperatura ambiente, con agitación constante durante 15, 30, 45 y 60 minutos. El eluido se neutralizó con Tris 1 M, pH 8,5, y luego se intercambió de tampón a solución salina tamponada con fosfato (Figura 1). El porcentaje de recuperación de mIgM, se determinó mediante el porcentaje de anticuerpos funcionalmente activos que no fueron capturados por las PM. Para ello, se calculó la DO del SCC después de la incubación con PM, y se restó la DO del SCC en la proporción de referencia, luego todo ese valor se multiplicó por 100. La proporción de referencia es 400 µg de PM a 100 µl de SCC, ya que mediante ELISA se observó que no quedaba mIgM en el SCC después de la incubación con PM. La IgM purificada se concentró utilizando un filtro con corte mínimo de 10kDa (Amicon® Ultra Centrifugal Filters, C7719; Merk Millipore, EE. UU.). La pureza del eluido se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con sulfato de sodio y dodecilo (sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) en condiciones reductoras utilizando geles de poliacrilamida al 10% y tinción con azul de Coomassie (Kurien *et al.*, 2012).

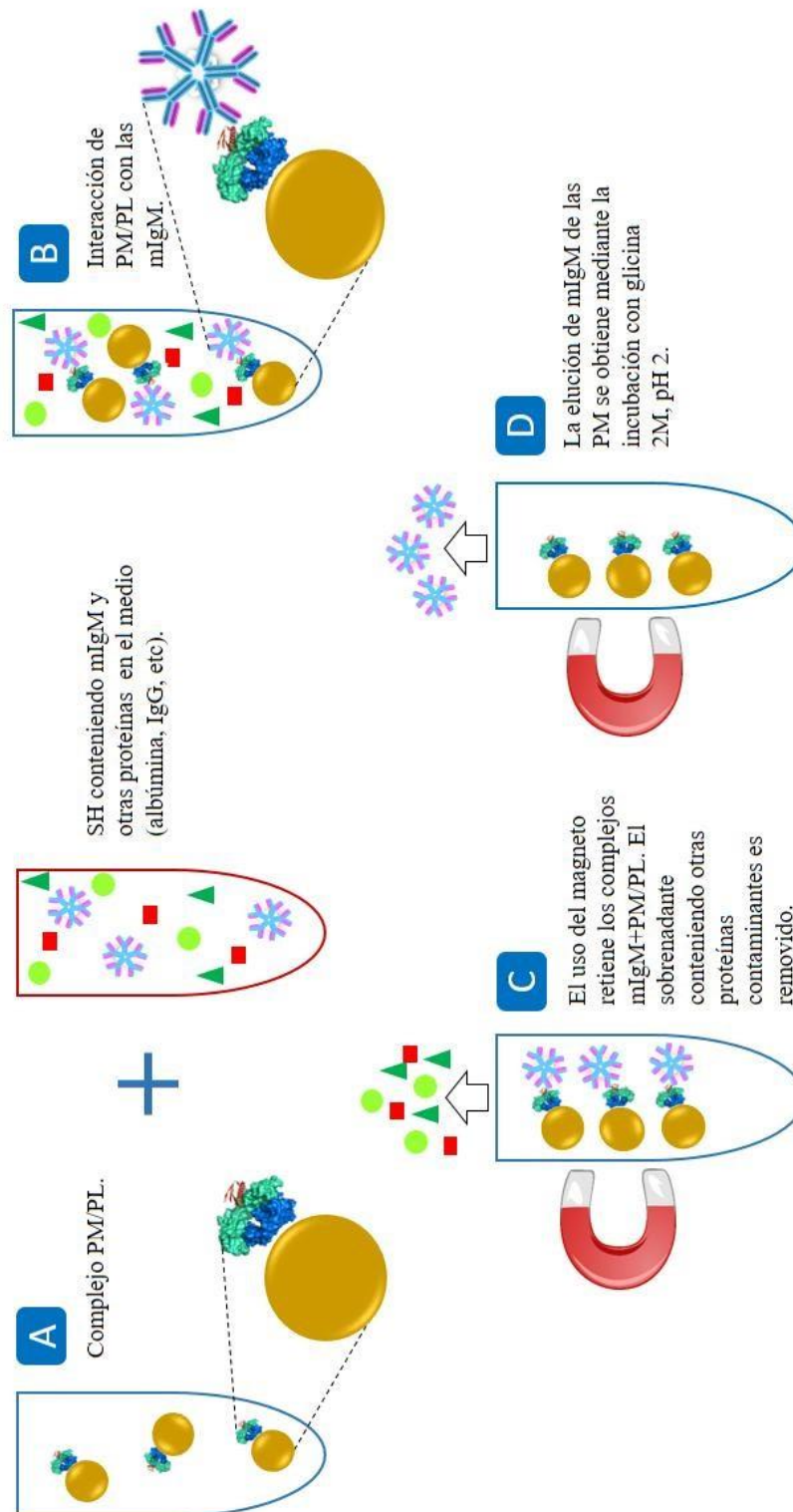


Figura 1. Proceso de purificación de anticuerpos monoclonales IgM a partir de sobrenadante de cultivo celular, mediante el uso de partículas magnéticas unidas a proteína L.

A y B: Los anticuerpos monoclonales IgM (mIgM) presentes en el sobrenadante de cultivo celular (SCC) se unirán en solución a la proteína L (PL) acopladas en las partículas magnéticas (PM).

C: Las partículas magnéticas (PM) se separan del SCC con ayuda de un soporte magnético.

D: Los mIgM purificados se eluyen de las PM utilizando una solución ácida de glicina.

5.2. Síntesis de nanopartículas de oro a través de la reducción de citrato

Se preparó nanopartículas de oro (NpAu) esféricas basado en la reducción de una sal de oro soluble en agua ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, ácido tetracloroáurico), la reducción fue con iones de citrato (sal de sodio de ácido cítrico), para el proceso se utilizó el método descrito por Turkevitch et al., 1951, con algunas modificaciones. En este método el citrato cumple la función de agente reductor y estabilizador aniónico de las partículas (Hu M et al., 2006). El método se ha modificado para obtener NpAu con tamaños entre 15 a 20 nm. Todos los materiales de vidrio y las barrar de stirring son limpiadas en solución de aqua regia (3:1 v/v HCl 35%/HNO₃ 65%), debido a que el oro tiende a reaccionar rápidamente con cualquier compuesto.

Se preparó 50 ml de la solución $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 0.25 mM y se incubó sobre una placa de homogenización a 250°C y 300 r.p.m. aproximadamente por 15 minutos hasta que entre en punto de ebullición. Para la reducción del ácido tetracloroáurico, se agregó 1.25 ml de citrato de sodio al 1%, y se dejó incubando 5 minutos hasta que cambie de color azul a rojo. Cuando se consigue el color rojo se incuba 15 minutos adicionales a temperatura ambiente para la estabilización de las nanopartículas en suspensión coloidal. La solución puede almacenarse hasta por dos meses a 5°C protegido de la luz.

El control de calidad de la síntesis de NpAu se realizó considerando dos parámetros: el tamaño y el espectro de absorción. El tamaño se midió mediante el uso de un Microscopio Electrónico de Transmisión, TEM, JEM-2010. El espectro de absorción se calculó mediante el uso de un Espectrofotómetro de UV-visible, U-3010.

5.3. Adsorción del anticuerpo mIgM a la NpAu

Las diferentes biomoléculas tienen distintos modos de interacción con la NpAu (Figura 2), en caso de los anticuerpos IgM la interacción con la NpAu es a través de la carga negativa del ligando citrato (Zhang *et al.*, 2014).

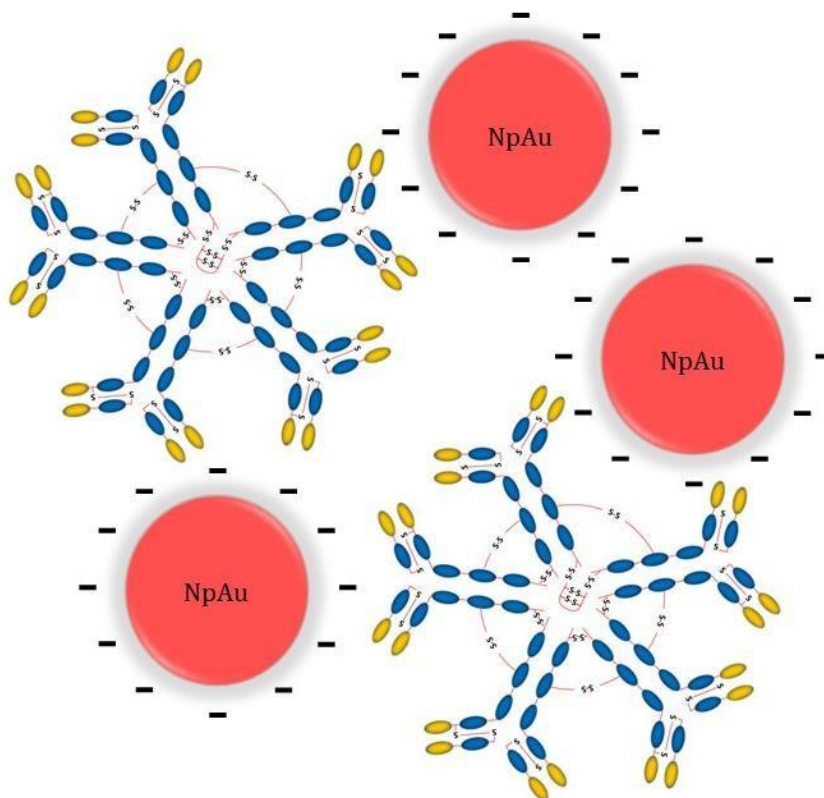


Figura 2. Adsorción del anticuerpo monoclonal IgM a la NpAu, a través de la interacción con el citrato en la superficie de la partícula.

Figura modificada a partir de Zhang et al., 2014.

Por otro lado, los nanomateriales tienen la propiedad de interactuar con la luz. Cuando la luz golpea una NpAu, los electrones libres del metal rápidamente forman un campo electromagnético, lo que conlleva a vibraciones colectivas que son responsables de la resonancia del plasmón de superficie (RPS) (Ogarev *et al.*, 2018; Dreaden *et al.*, 2012). En NpAu con 50 nm el pico de RPS está posicionado a 520 nm (Figura 3) (Hu M *et al.*, 2006). La adsorción de biomoléculas en la NpAu afecta

ligeramente la posición del pico de RPS. Sin embargo, la agregación de NpAu causa incremento de tamaño, y la longitud de onda del RPS relacionada con la luz absorbida se desplaza hacia la zona visible del espectro electromagnético, que corresponde al color rojo, es decir, se absorbe luz roja y se emite luz azul, y la solución tendrá una coloración violeta purpura (Ogarev *et al.*, 2018).

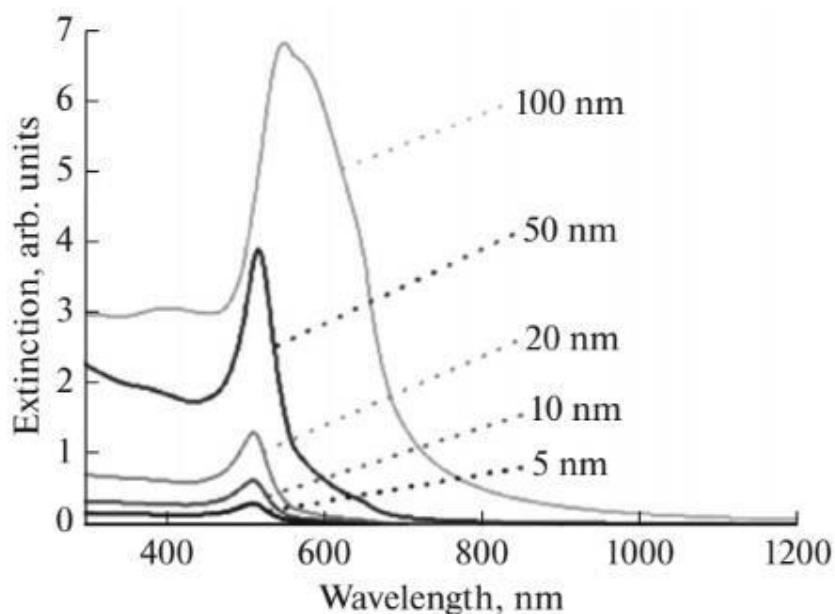


Figura 3. Pico de resonancia de superficie plasmónica en nanopartículas de oro con tamaños de 5-100 nm. Figura adquirida de Hu M et al., 2006.

Ambas propiedades del IgM y de la NpAu se ha utilizado para caracterizar la adsorción de mIgM en NpAu mediante el Test de Agregación del Oro. El test de agregación del oro se basa en el uso de cloruro de sodio (NaCl) que actúa como un desestabilizador de la carga superficial de la nanopartícula, mediante la interacción directa con el citrato de sodio. Una vez que la carga superficial se altera, las partículas comienzan aglomerarse incrementando su tamaño, y finalmente el color de la solución inicial cambia de rojo a azul. Por el contrario, el NaCl no llega a tener algún efecto en las partículas que estén cubiertas en su totalidad con el anticuerpo y tengan un pH óptimo de estabilidad. El cambio de color se cuantifico mediante

espectrometría de UV-visible, U-3010, con absorbancias entre 400 - 600 e intervalos de 10nm de longitud de onda.

Así como la NpAu tiene la propiedad de interactuar con la luz, también son excelentes dispersores de la luz cerca de RPS (Jans *et al.*, 2009). Utilizando la herramienta analítica de dispersión de la luz dinámica, se calculó el tamaño hidrodinámico de la NpAu antes y después de adsorber el mlgM. La NpAu sintetizada en el presente estudio presenta una carga negativa, dicha característica se utilizó para determinar la carga superficial mediante el uso del potencial zeta.

Dentro del proceso general de caracterización se evaluó dos parámetros, la concentración y el pH óptimo del mlgM. A la solución de NpAu se agregó buffer de estabilización (buffer borato 10 mM, pH 9.36), y con la ayuda de tiras reactivas se comenzó ajustar el pH a varios puntos, pH7, pH8 y pH9. En cada punto de pH se agregó el mlgM a diferentes concentraciones 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, y 100 µg/ml. La proporción en volumen de NpAu: mlgM fue 15:1. La solución de NpAu/mlgM se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en una placa de shaker a 650 r.p.m. Pasado los 30 minutos se agregó 100 µl de solución bloqueante, PBS-tween 0.05%-BSA 1%, y se dejó incubando 20 minutos adicionales. El exceso de mlgM y BSA no absorbido por la NpAu se removió centrifugando la muestra a 14'000 r.p.m. por 20 minutos a 4°C. Con cuidado se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 500 µl de Buffer Borato 2 mM, pH 7.4 enriquecido con sucrosa al 10%.

5.4. Validación de la prueba rápida en orina humana

a. Ensamblaje de la prueba rápida

El soporte principal de la plataforma de lateral flow es la membrana de nitrocelulosa, dimensiones 6 cm x 30 cm (Hi-Flow Plus 180 Membrane Cards, HF180MC100; Millipore, Billerica, EE. UU.). La membrana de nitrocelulosa captura y retiene proteínas con extremo terminal NH_3^+ u COO^- , ya que contiene grupos nitro. Mediante un dispensador de reactivo (IsoFlow™ Reagent Dispenser, Hanover,

USA), voltaje 4.5 mV, velocidad 0.25 ml/min, se impregnó los anticuerpos en la superficie de la membrana de nitrocelulosa. En la línea de control se impregnó 12.5 µg de anti-mouse IgG, y en la línea de prueba 12.5 µg del anticuerpo monoclonal IgM TsW₈, la membrana se dejó secando 2 horas a 37°C. Posteriormente se agregó buffer fosfato-tween 0.05%-BSA 2% (Bovine Serum Albumin, 9048-46-8; Sigma, Madrid, España), y se dejó incubando 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de 5 lavados con buffer fosfato-tween 0.05%.

Sobre el soporte de nitrocelulosa se adhiere la fibra de vidrio, dimensiones 0.6 cm x 30 cm (Glass Fiber Conjugate Pads, GFDX 000800; Millipore, Billerica, EE. UU.), en la fibra de vidrio se adhiere el complejo NpAu/mlgM TsW₅, y se deja secar 16 horas a temperatura ambiente. Dentro de los componentes del buffer de resuspendió del complejo esta la sucrosa, que tiene la función de cristalizar la NpAu/IgM cuando se deja secar en fibra, por lo que evita la degradación rápida del IgM.

Inmediatamente después se adhiere la membrana de celulosa, dimensiones 1.7 cm x 30 cm (Cellulose Absorbent Sample Pads, CFSP0 017 00; Millipore, Billerica, EE. UU.), la membrana de celulosa va en ambos extremos de la prueba. En un extremo está la membrana de muestra que es tratada con PBS 10 mM, pH7.4, tween 0.01%, BSA 1% y secada por 2 horas a 37°C. Al otro extremo está la membrana de absorción, que absorbe el excedente de muestra. Se obtuvo tiras de 0.5 cm x 6 cm a partir del sistema armado (Figura 4), mediante el uso de la guillotina (Dahle 533, Alemania).

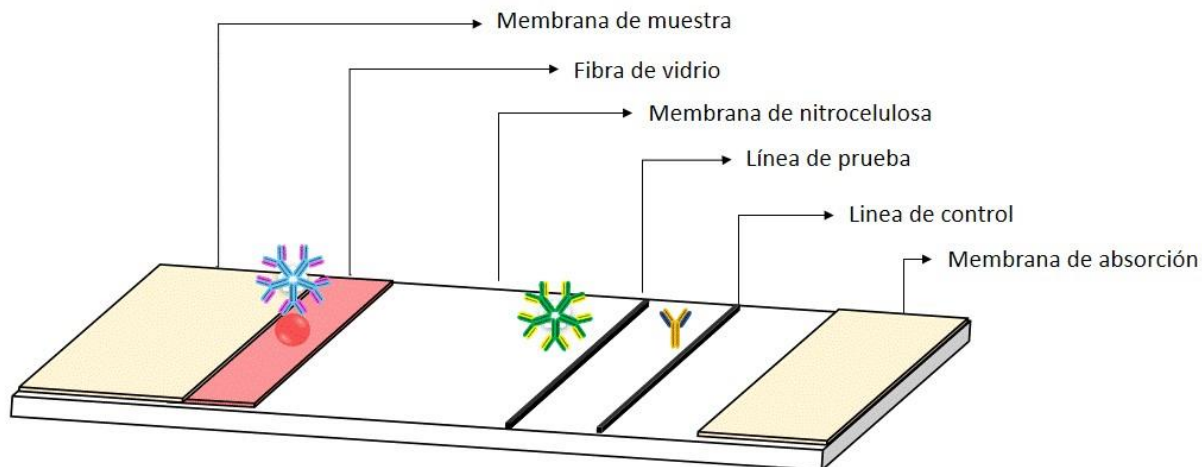


Figura 4. Ensamblaje de una prueba rápida.

El proceso de flujo comienza cuando la muestra se agrega sobre la membrana de muestra. Si la muestra lleva consigo el antígeno, la porción del epítopo será reconocido por el anticuerpo monoclonal IgM (TsW₈) presente en la NpAu inmovilizado previamente en la fibra de vidrio. El complejo migra a través de los poros en la membrana de nitrocelulosa. Finalmente, un segundo anticuerpo monoclonal (TsW₅) inmovilizado en la línea de prueba entra en contacto con un epítopo distinto del antígeno dando una reacción de color rojo, dicha reacción es posible visualizar a simple vista. El excedente de NpAu/IgM que no formó el complejo antígeno-anticuerpo reacciona con el anti-mouse IgG inmovilizado en la línea de control (Figura 5.a). Si la muestra no lleva consigo el antígeno, el complejo NpAu/IgM inmovilizado en la fibra de vidrio, migrará directamente a la línea de control donde se encuentra inmovilizado el anti-mouse IgG, y se observará una sola línea de reacción (Figura 5.b).

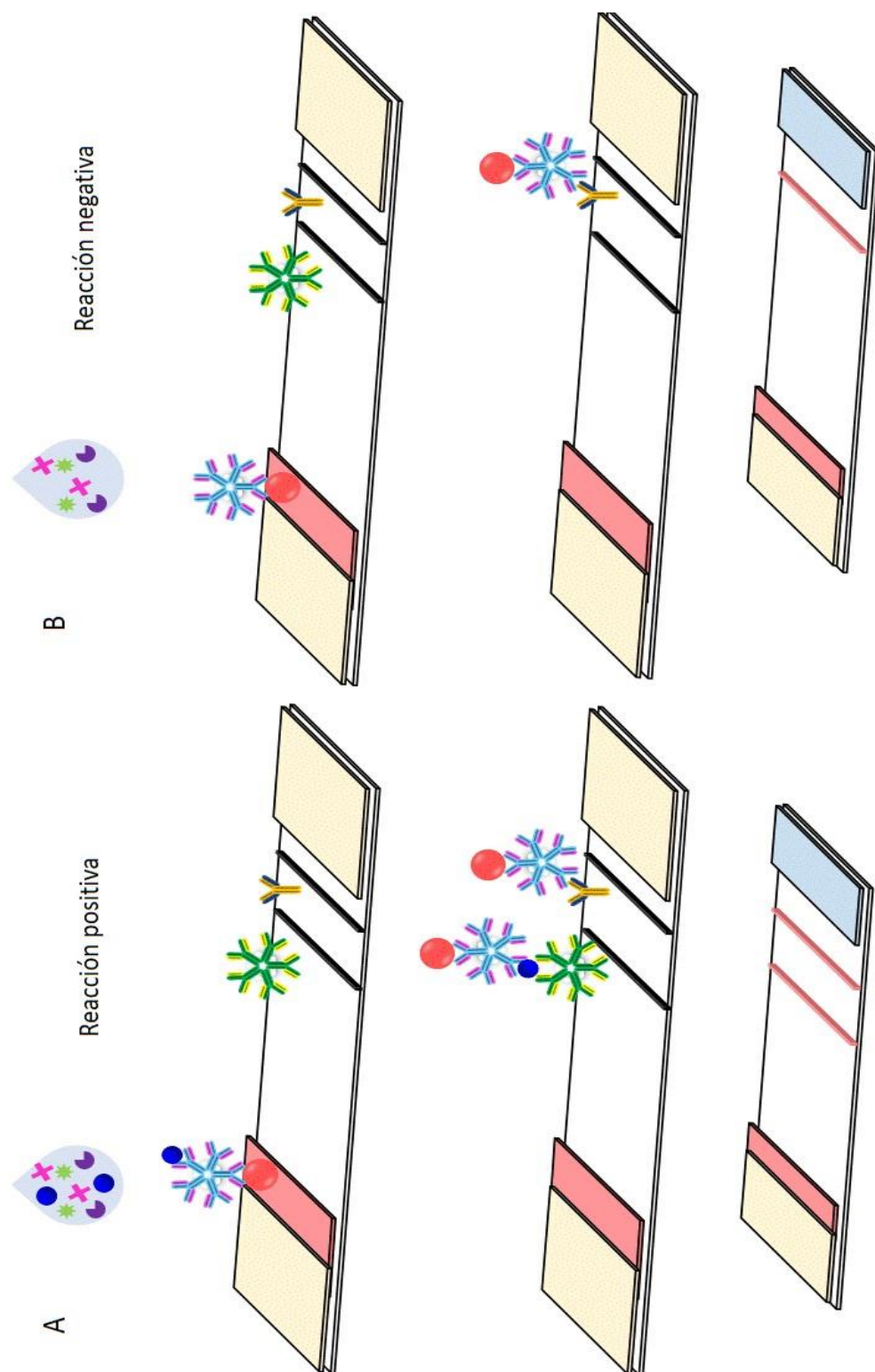


Figura 5. Migración de la NpAu/mlgM a través de la membrana de nitrocelulosa.

*A. Presencia del antígeno de *T. solium* en la muestra. La región epítipo del antígeno es reconocido por el anticuerpo monoclonal IgM presente en la NpAu, dando finalmente una reacción de color rojo de dos líneas, correspondiente a la línea de prueba y la línea de control.*

*B. Ausencia del antígeno de *T. solium* en la muestra. El anticuerpo monoclonal IgM presente en la NpAu reacciona únicamente con la línea de control, dando una sola línea de color rojo.*

b. Evaluación de la prueba rápida

La prueba rápida fue evaluada con respecto al límite de detección (siglas en inglés, LOD) y límite de cuantificación (siglas en inglés, LOQ). El LOD indica la concentración más baja detectable por espectrofotometría de UV-vis y el LOQ indica la concentración más baja capaz de ser cuantificable. Para determinar el LOD y el LOQ se realizó una curva de calibración con el antígeno somático de *T. solium* en orina humana control en un rango de 20 a 500 ng/ml. Como “gold standard” se utilizó un ensayo de ELISA.

El Laboratorio de Inmunología Parasitaria – LIEI, UPCH, nos proporcionaron muestras de orina humana que pasaron el control de calidad por EITB y ELISA para demostrar ausencia del antígeno de *T. solium*.

c. Validación de la prueba rápida en orina humana de pacientes con neurocisticercosis

Para el proceso de validación de la prueba rápida se analizó 37 muestras, 12 muestras correspondientes a personas antígeno de *T. solium* negativo por EITB, ensayo de ELISA, y 25 muestras correspondientes a pacientes con diagnóstico de neurocisticercosis por neuroimagen y Western blot. La Unidad de Cisticercosis del Hospital Santo Toribio de Mogrovejo, ICN, nos proporcionaron muestras de orina.

El protocolo de la prueba rápida, previamente fue estandarizado. Primero se agrega la muestra de orina en la membrana de absorción, dilución 1/2 (150 µl de la muestra + 150 µl de tampón fosfato, tween 0.05%). Se deja incubando 5 minutos, pasado el

tiempo se realiza dos lavados con 100 μ l de tampón fosfato, tween 0.05%. Luego se deja otros 5 minutos para que la reacción complete. La prueba rápida tiene una duración promedio de 10 a 15 minutos. La intensidad de la línea de reacción se cuantifico con un lector colorimétrico, model ESE Quant Lateral Flow reader; Qiagen Inc., Alemania. Finalmente, el análisis de los datos se realizó en el programa de Graphpad Prism, versión 7.0.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Purificación de anticuerpos monoclonales IgM a partir de sobrenadante de cultivo celular

a. Métodos de concentración para sobrenadante de cultivo celular

Se evaluaron tres métodos de concentración de SCC (filtración por presión, ultrafiltración pasiva y ultrafiltración por centrifugación). Respecto a la concentración de proteínas por el método de Bradford y calculando el factor de concentración, se determinó que usando filtración por presión se obtiene valores altos (4.4 veces), seguido por ultrafiltración pasiva (3.9 veces) y finalmente ultrafiltración por centrifugación (2.5 veces). En términos de actividad del mIgM realizado en un ensayo de ELISA, las tres metodologías produjeron un porcentaje de recuperación superior al 80% (filtración por presión: 92.5%-95%, ultrafiltración pasiva: 84.2%-93.9% y ultrafiltración con centrifugación: 82.1%-84.3%).

Usando el método de filtración por presión se observó en dos ocasiones precipitación de proteínas, posiblemente a que las fuerzas mecánicas y el aumento de la temperatura llevó a la desolubilización del mIgM. Por otro lado, el proceso de filtración por presión y ultrafiltración pasiva toma ~5 horas, a diferencia de ultrafiltración por centrifugación que demanda ~15 minutos. Finalmente, para minimizar la precipitación de IgM, y debido al menor tiempo de proceso se recomienda para futuros análisis usar ultrafiltración por centrifugación.

b. Purificación de anticuerpos mIgM

Mediante el uso de partículas supermagnéticas (0.5 μm de radio medio) acopladas covalentemente con proteína L recombinante se purificó mIgM a partir del SCC. Se evaluó la proporción óptima de μg de PM a μl de SCC utilizando como referencia la proporción de 400 μg de PM a 100 μl de SCC. Calculamos el porcentaje de mIgM funcionalmente activos que no fueron capturados por las PM restando el valor de DO del SCC después de la incubación con PM menos el valor de DO del SCC en la proporción de referencia multiplicado por 100. Se encontró que el porcentaje de

pérdida más bajo se obtuvo utilizando 400 µg de PM con 250 µl de SCC (0.6%), y el porcentaje de recuperación (PR) más alto se obtuvo utilizando 400 µg de PM con 500 µl de SCC (99.3%) (Tabla 1). Es decir, el mejor PR de mIgM se produce cuando la proporción de µg de PM a µl de SCC es 0.8, pues en este rango el porcentaje de recuperación es >91%. El PR (> 90%) es más alto que el reportado previamente en otros estudios usando PM acopladas con anticuerpos anti-IgM (70%) (Quitadamo *et al.*, 1998), probablemente debido a la mayor afinidad de la PL al anticuerpo IgM.

Tabla 1. Protocolo de optimización para la purificación de mIgM a partir de SCC utilizando PM.

Proporción de PM a µl SCC	Vol. Inicial SCC (µl)	DO del sobrenadante después de incubación con PM (A)	Actividad del mIgM que no ha sido capturado por las PM (%) (A-Referencia) *100)	Actividad inicial del mIgM en el volumen total (B)	Actividad del mIgM en el eluido (C)	Recuperación (%) (C/B*100)
4	100	0.088 ± 0.005	Referencia	7.12	6.63	93.12
1.6	250	0.094 ± 0.004	0.60	16.58	15.48	93.40
0.8	500	0.115 ± 0.004	2.70	33.00	32.80	99.30
0.53	750	0.146 ± 0.003	5.80	49.70	45.33	91.20
0.4	1000	0.182 ± 0.010	9.40	66.30	57.41	86.60
0.26	1500	0.328 ± 0.006	24.00	99.50	55.72	56.00

Se agregó 400 µg de PM (partículas magnéticas acopladas a proteína L) al sobrenadante de cultivo celular (SCC) en un volumen final de 1500 µl de solución salina tamponada con Tris como un tampón de unión. DO: densidad óptica medida a 590 nm de longitud de onda. La actividad del anticuerpo mIgM se midió por el ensayo de ELISA, y se determinó la capacidad de las mIgM para reconocer quistes sonicados de *T. solium*.

La mayoría de columnas de cromatografía de afinidad garantizan un alto porcentaje de recuperación, cuando la muestra tiene una concentración aproximada de 1 mg/ml

(GE Healthcare). Sin embargo, en sobrenadante de cultivo celular las proteínas se secretan a bajas concentraciones, lo que dificulta su recuperación (Chevallet *et al.*, 2007). Algunos autores recomiendan un paso de pre-concentración del medio de cultivo para aprovechar la frecuencia de oportunidades de interacción antígenoanticuerpo (Quitadamo *et al.*, 1998). Por otro lado, la mayoría de sobrenadantes de cultivo celular son ricos en sales, suero de albumina bovino, y otros que interfieren con la mayoría de técnicas de cromatografía de afinidad (Chevallet *et al.*, 2007). La interacción de la albumina con proteínas hidrofóbicas representan un significativo problema para una purificación efectiva (Menge *et al.*, 1987).

En el presente trabajo, se evaluó si es necesario un paso de pre-concentración antes de incubar el SCC con las PM. El análisis consistió en comparar el PR obtenido con 50 µl de SCC concentrado (volumen inicial 2500 µl, factor de concentración 50x) y el PR de 2500 µl de SCC no concentrado. Cuando el SCC es concentrado se obtiene un PR de 95.46% (coeficiente de variación, CV: 0.77), y cuando el SCC no es concentrado se obtiene un PR de 96.93% (CV: 0.43%). Se muestra que las partículas magnéticas se pueden usar para concentrar IgM en sobrenadante de cultivo celular en un solo paso, reduciendo la manipulación de los anticuerpos que puede conducir a su degradación y desnaturalización. Además, el uso de partículas magnéticas favorece la interacción exclusiva de la proteína L con la región variable de la cadena ligera kappa del mIgM en un solo paso, sin pasos de pre-concentración del sobrenadante de cultivo celular. Además, que la proteína L no reacciona con IgGs de especies bovina y caprina que generalmente están presentes en sobrenadantes de cultivo celular enriquecidos con suero de estos animales, y previene la pérdida de la actividad inmunogénica de los mIgM, ya que no se une a otras resinas como podría ocurrir en métodos de cromatografía de afinidad (Paloni *et al.*, 2017; Kruger *et al.*, 1994).

Los mIgM se eluyeron de las PM utilizando un tampón de glicina, pH 2. Según recomendaciones del fabricante, el tiempo de elución ácida debería no ser mayor a 15 minutos, con el fin de prevenir la degradación del anticuerpo. Pierce™ Protein

L Magnetic Beads, Thermo Scientific, EE. UU. Sin embargo, en este estudio observamos que el tiempo de elución a 15 minutos tiene un PR de 78.5%, basado en la actividad del anticuerpo, y el PR se incrementa cuando el tiempo de elución es 45 minutos (94.1%). Por otro lado, se notó una disminución de la actividad del anticuerpo cuando el tiempo de elución es 60 minutos (83%), probablemente debido a un cierto grado de desnaturalización causada por el pH. El requerir un tiempo de elución de mIgM más largo que el recomendado por el fabricante (45 min versus 15 min), puede estar detallado en que la interacción IgM-proteína L requiere mayor tiempo, según la constante de asociación del IgM con la proteína L ($K_a = 10^{10} \text{ M}^{-1}$) (Gautam *et al.*, 2011). Además, el mayor tiempo de elución requerido no afecta la integridad del IgM, debido a que existe reportes que la IgM es capaz de resistir exposición a pH ácido (Walker *et al.*, 1995).

La pureza de la mIgM se observó por SDS-PAGE. Antes de la purificación se observa diferentes proteínas, principalmente albúmina (67 kDa). Después del proceso de purificación con PM, se observaron solamente dos bandas de 73 kDa y 25 kDa correspondientes a la cadena pesada y ligera respectivamente del mIgM, confirmando la pureza de los eluidos (Figura 6). Basado en los resultados de electroforesis en condiciones reductoras, se mostró que el uso de la proteína L, produce un eluido de IgM altamente purificada sin la contaminación de IgG presente en suero bovino que es usado como suplemento en medios de cultivo celular (Nilson *et al.*, 1993).

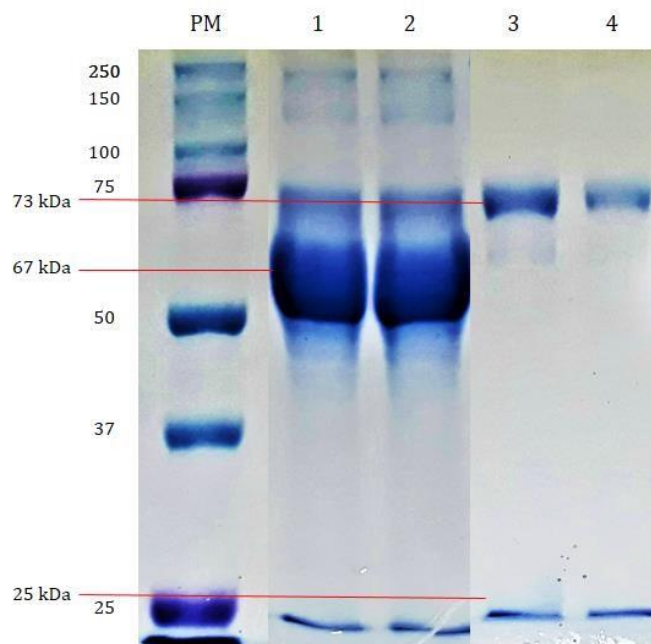


Figura 6. Tinción con azul de Coomassie después del SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio) al 10% de los anticuerpos monoclonales IgM (TsW8 y TsW5) antes y después de la purificación con partículas magnéticas acopladas a proteína L.

PM: Marcador de peso molecular en kDa (Precision Plus Protein, Bio-Rad).

Canal 1 y 2: Sobrenadante de hibridoma (TsW8 y TsW5, respectivamente) antes de la purificación con partículas magnéticas acopladas a proteína L, se observa la presencia de albúmina (67 kDa). Canal 3 y canal 4: Anticuerpo monoclonal IgM purificado (TsW8 y TsW5, respectivamente) después de la incubación con partículas magnéticas acopladas a proteína L, se observan las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo 25 kDa y 73 kDa, respectivamente, sin la presencia de albúmina.

Por recomendaciones de la empresa, Pierce™ Protein L Magnetic Beads, Thermo Scientific, las partículas magnéticas pueden volverse a usar. En este estudio se evaluó el número de veces que podría hacerse uso de las partículas. Para ello, se recolectó el eluido de cada uso, y considerando la actividad del anticuerpo por ensayo de ELISA se demostró que las partículas se pueden usar hasta 22 veces.

La densidad óptica no varía significativamente en el primer uso ($OD: 2.74 \pm 0.06$) y el ultimo uso ($OD: 2.91 \pm 0.02$) (Tabla 2). Lo que indica que es posible usar las partículas magnéticas hasta 22 veces, sin afectar el rendimiento de la purificación ($PR > 90\%$).

Tabla 2. Numero de usos de las partículas magnéticas en la purificación de anticuerpos monoclonal IgM.

Número de usos de las PM	DO del eluido después de incubación con PM (A)	Recuperación (%) (A/control*100)
Control	2.99 ± 0.02	
1	2.74 ± 0.06	91.45
2	2.84 ± 0.01	94.79
3	3.06 ± 0.02	102.42
4	3.08 ± 0.01	102.87
5	2.83 ± 0.03	94.33
6	2.94 ± 0.03	98.09
7	3.03 ± 0.04	101.05
8	2.94 ± 0.03	98.05
9	2.65 ± 0.03	88.37
10	2.82 ± 0.04	94.09
11	3.05 ± 0.04	101.74
12	2.89 ± 0.02	96.65
13	2.89 ± 0.03	96.51
14	2.67 ± 0.01	89.34
15	2.86 ± 0	95.59

16	2.91 ± 0.05	96.96
17	2.99 ± 0.01	99.88
18	2.75 ± 0.01	91.72
19	2.74 ± 0.01	91.57
20	2.82 ± 0.06	94.28
21	2.73 ± 0.08	91.21
22	2.91 ± 0.02	97.23

*Se utilizó el eluido, después de incubar con las PM (partículas magnéticas acopladas a proteína L) el sobrenadante de cultivo celular (SCC). DO: densidad óptica medida a 590 nm de longitud de onda. La actividad del anticuerpo mlgM se midió por el ensayo de ELISA, y se determinó la capacidad de las mlgM para reconocer quistes sonicados de *T. solium*.*

Finalmente, el corto tiempo de manipulación (2 horas en total) en comparación con métodos de cromatografía de afinidad clásicos (10 horas a 2 días) contribuye al menor riesgo de desnaturalización de las mlgM y aumenta su probabilidad de resistencia a la elución ácida (Hober *et al.*, 2007). Presentamos los resultados de optimización de concentración y purificación de mlgM a partir del sobrenadante de hibridoma usando una plataforma sencilla basada en el uso de partículas magnéticas y proteína L. Esta metodología puede ser adaptada a laboratorios no especializados en concentración de proteínas ya que no requiere el uso de columnas o ultracentrífugas, facilitando su implementación.

6.2. Síntesis de nanopartículas de oro

Se sintetizaron nanopartículas de oro (NpAu) mediante la reducción de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ con citrato de sodio siguiendo el método descrito por Turkevitch *et al.*, 1951, con algunas modificaciones. El espectrofotómetro de UV-visible muestra que el espectro de absorción es a 520 nm, lo que evidencia dispersión de las NpAu en suspensión coloidal (Figura 7). La forma esférica y dispersión de las partículas se ha observado por el microscopio de electrónico de transmisión (siglas en inglés, TEM). El tamaño promedio de la NpAu sintetizadas es aproximadamente de 16.79 ± 0.89 nm (Figura 8).

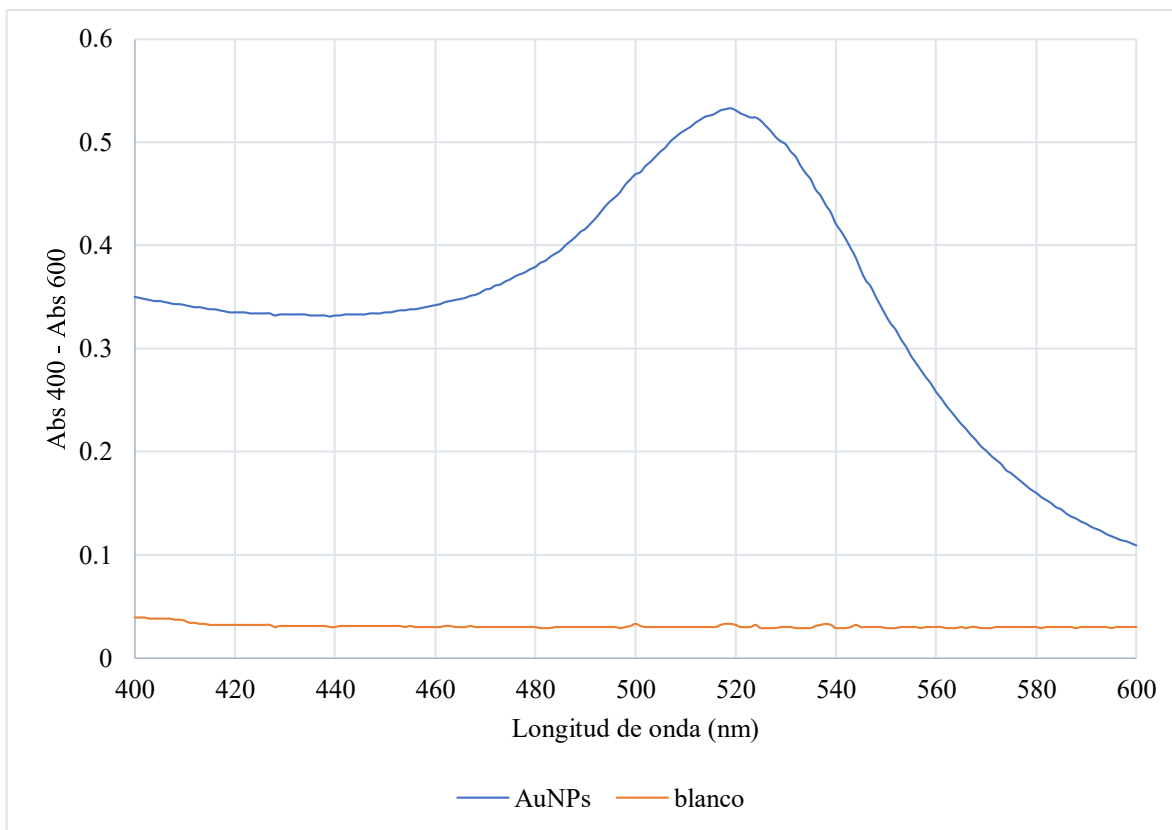


Figura 7. Espectro de absorción de las NpAu a 520 nm, por espectrometría de UVvisible con rangos de 400 a 600 nm e intervalos de 10 nm.

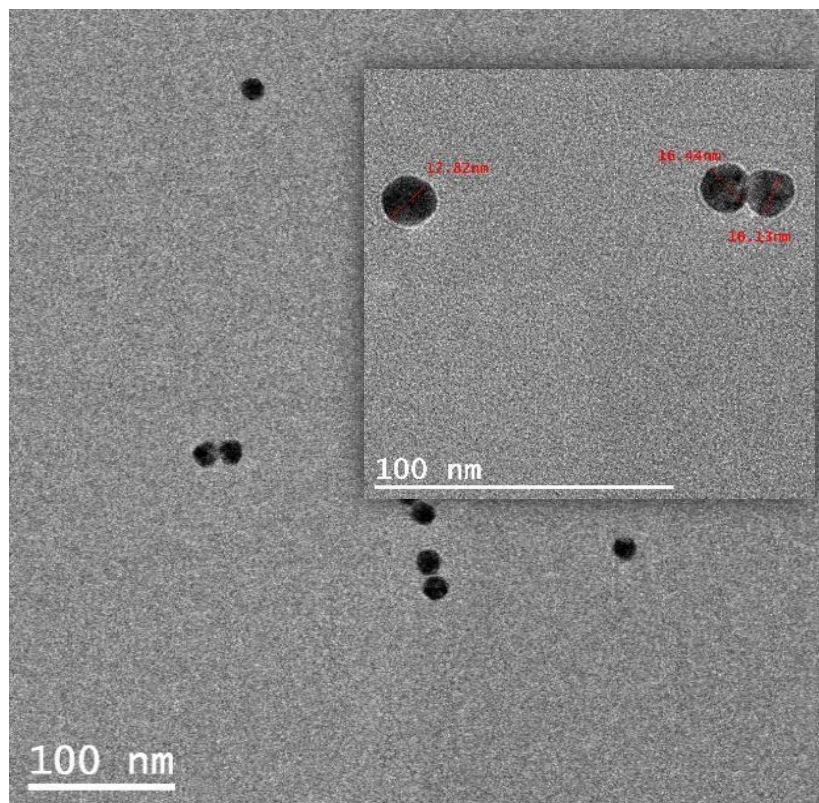


Figura 8. Observación de la forma esférica y tamaño de la NpAu a través del microscopio electrónico de transmisión.

Después de la síntesis de las nanopartículas de oro, se realizó una evaluación por espectrometría de UV-visible a diferentes intervalos de tiempo (horas, días, semanas, meses) para verificar la estabilidad en suspensión coloidal. La figura 9, muestra datos de UV-visible de la NpAu tomadas después de 18 horas, 3 días, 3 semanas, 3 meses, respectivamente. Claramente no se observa cambios significativos en el pico de absorción a 520 nm.

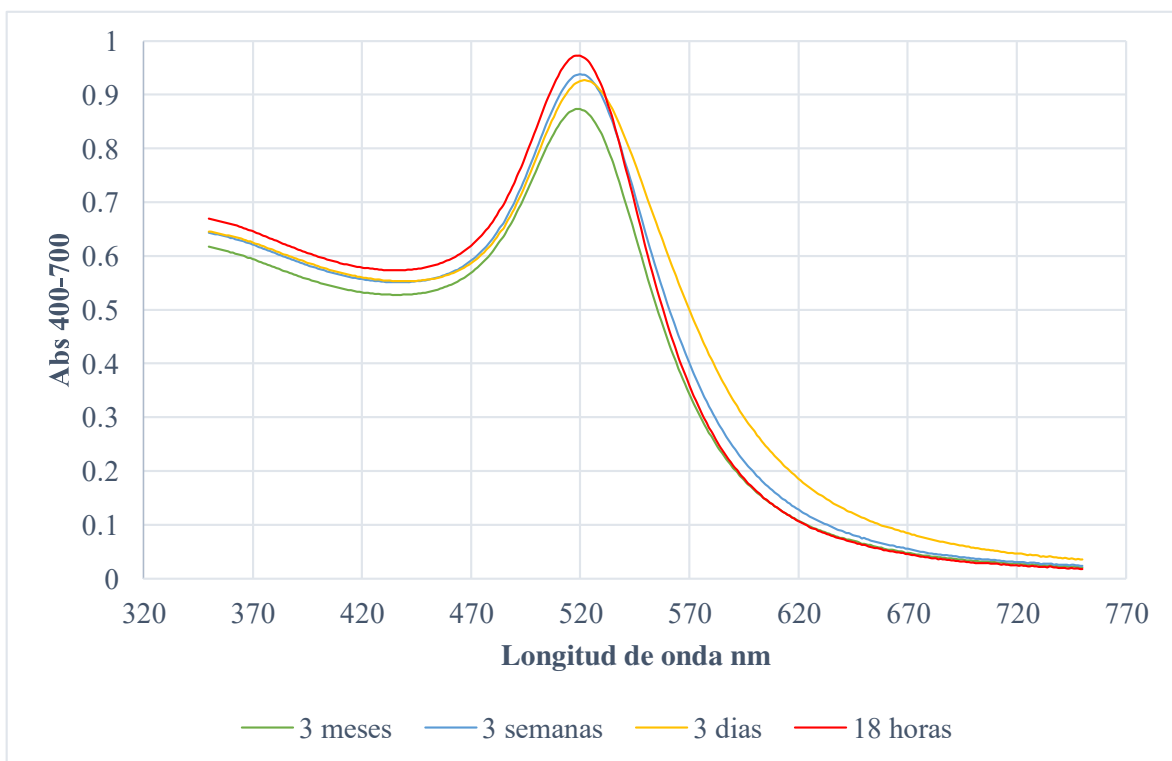


Figura 9. Evaluación de la estabilidad de NpAu por espectrometría de UV-visible con rangos de 350 a 750 nm e intervalos de 10 nm.

6.3. Adsorción del anticuerpo monoclonal IgM en la NpAu

La DLS es una herramienta primaria usada para estudiar la interacción de la NpAu con biomoléculas (Zhang *et al.*, 2014). La mayoría de biomoléculas son de varios nanómetros, por ejemplo, las inmunoglobulinas M tiene una estructura pentamérica con un tamaño aproximado de 35 nm (Saber *et al.*, 2011). La intensidad de la dispersión de la luz es proporcional al diámetro de la NpAu, partículas grandes son más sensible al DLS que en partículas pequeñas (James *et al.*, 2013). La NpAu sintetizada en el presente estudio tiene un tamaño aproximado de 17 nm, que en proporción de nanómetros se consideraría la mitad de un mIgM. Cuando el mIgM se adsorbe en la NpAu, el tamaño promedio de la NpAu se incrementa, la diferencia de tamaño se ha medido por DLS. La tabla 3, muestra que el diámetro aproximado de las NpAu sin adsorber el mIgM es aproximadamente 24.56 ± 0.91 nm. El tamaño

se incrementa conforme se incrementa la concentración de mlgM, de 26.45 ± 0.36 nm cuando se usa 10 $\mu\text{g/ml}$ a $57.68 \pm 0.19\text{nm}$ cuando se usa 100 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, a partir de 75 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$ el cambio de tamaño no es significativo, llegando de $57.58 \pm 0.92\text{nm}$ a $57.68 \pm 0.19\text{nm}$ respectivamente (Figura 10). Estos resultados indican que utilizar concentraciones superiores a 100 $\mu\text{g/ml}$ de mlgM no es necesario para adsorber en NpAu de un tamaño de 17 nm, pues su superficie se encuentra saturada.

Tabla 3. Concentración de mlgM vs diámetro hidrodinámico y carga superficial de la NpAu.

Concentración de mlgM ($\mu\text{g/ml}$)	Diámetro hidrodinámico (nm)	Carga superficial (mV)
0	24.56 ± 0.91	-58.70 ± 3.99
10	26.45 ± 0.36	-61.00 ± 4.21
25	37.54 ± 0.51	-71.10 ± 7.28
50	45.26 ± 0.79	-68.12 ± 2.22
75	57.58 ± 0.92	-51.97 ± 0.95
100	57.68 ± 0.19	-48.17 ± 2.31

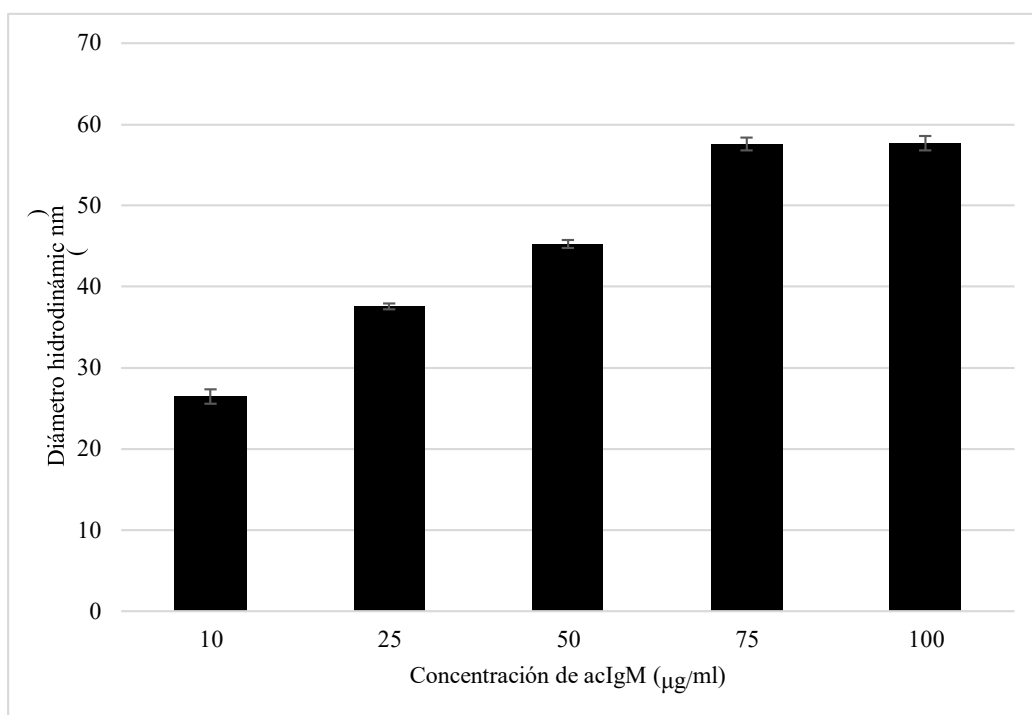


Figura 10. Punto de saturación respecto a la concentración de mlgM sobre la NpAu.

El análisis de potencial Z indica cambio de carga superficial cuando se trata nanopartículas con diferentes biomoléculas. El potencial zeta de la NpAu es cerca de -36 mV, y puede variar dependiendo del tipo de biomolécula que se adsorba en la NpAu (Saber *et al.*, 2011; Harrison *et al.*, 2017). Nanopartículas con una carga superficial $<-30\text{mV}$ presentan menor estabilidad, lo que conlleva a un proceso de agregación. Por el contrario, partículas con una carga superficial $>-30\text{mV}$ tienen mejor estabilidad en solución coloidal y son resistentes a la agregación (Saber *et al.*, 2011). En este estudio se evaluó si el adsorber mIgM en la nanopartícula afectaría su estabilidad. En la tabla 3, se muestra que la NpAu sin mIgM presenta una carga superficial de $-58.70 \pm 3.99\text{mV}$, este valor es superior al rango de estabilidad mencionado en Saber *et al.*, 2011, este dato indica que las nanopartículas sin biomoléculas son estables en solución coloidal. Cuando a la NpAu se adsorbe mIgM a diferentes concentraciones, la estabilidad de la NpAu no se ve afectada, manteniendo una carga superficial entre $-48.17 \pm 2.31\text{mV}$ y $-71.10 \pm 7.28\text{mV}$ (tabla 3), lo que indica que biomoléculas de un tamaño de 45 nm, como es el caso de las mIgM no llega afectar la estabilidad de la nanopartícula.

La NpAu está rodeada de dos capas de carga iónica negativa lo que provoca fuerzas electrostáticas repulsivas cuando se suspende en solución electrolítica. En tal solución las moléculas de agua migran hacia la superficie cargada de la nanopartícula y forma una capa de solvatación, lo que garantiza el estado coloidal de la nanopartícula. Sin embargo, cuando se adiciona sal a la solución, la doble capa iónica y la capa de solvatación se comprime, lo que induce la agregación de las NpAu (Hui *et al.*, 2011). El test de agregación del oro, es un método clásico cuyo principio se basa en el uso cloruro de sodio, que actúa como un desestabilizador de la carga superficial de la nanopartícula mediante la interacción directa con el citrato de sodio presente en la superficie de la NpAu. Este proceso normalmente sucede cuando la superficie de la NpAu está descubierta, por el contrario, cuando su superficie se encuentra apantallado por anticuerpos o proteínas, el NaCl no accede al citrato manteniendo así la estabilidad de la NpAu. Hui *et al.*, 2011, demostraron que después de inmovilizar anticuerpos IgM en nanopartículas de oro, el pico de dispersión de la luz se desplaza de 550 nm a 580 nm, lo que mejora la estabilidad

de las nanopartículas de oro. Sin embargo, si no hay un buen apantallamiento de la NpAu, esta comienza aglomerarse, lo que conlleva a un incremento de tamaño y finalmente un cambio de coloración de rojo a azul.

En el presente estudio se utilizó el test de agregación del oro para determinar la concentración óptima de mIgM necesario para apantallar la superficie de la NpAu. Para ello se adsorbió diferentes concentraciones de mIgM en la NpAu, luego se agregó 500 mM de NaCl. El espectro de absorción de la NpAu es a 520 nm, y el cambio de color se cuantificó mediante espectrometría de UV-visible, con rangos de absorbancias entre 400 y 600 nm e intervalos de 10nm de longitud de onda. El grafico 4, muestra que en la NpAu sin mIgM su espectro de absorción se direcciona en valores >600nm, y conforme se incrementa la concentración de mIgM de 25 µg/ml a 50 µg/ml el espectro comienza a estabilizarse entre 520 nm a 550 nm. Sin embargo, cuando la concentración de mIgM es >100 µg/ml el espectro de absorción se estabiliza en ~520nm, demostrando que la concentración optima de mIgM para apantallar las NpAu es de 100µg/ml a 200µg/ml. De similar forma en la figura 12, muestra que la NpAu no está totalmente apantallada con mIgM cuando la concentración es entre 0µg/ml y 75µg/ml, por lo que la solución toma una coloración azul, indicando aglomeración de NpAu. Por el contrario, cuando la NpAu se encuentra totalmente cubierta de mIgM (100µg/ml - 200µg/ml) la solución mantiene una coloración rojo intenso, indicando dispersión de las nanopartículas en solución coloidal.

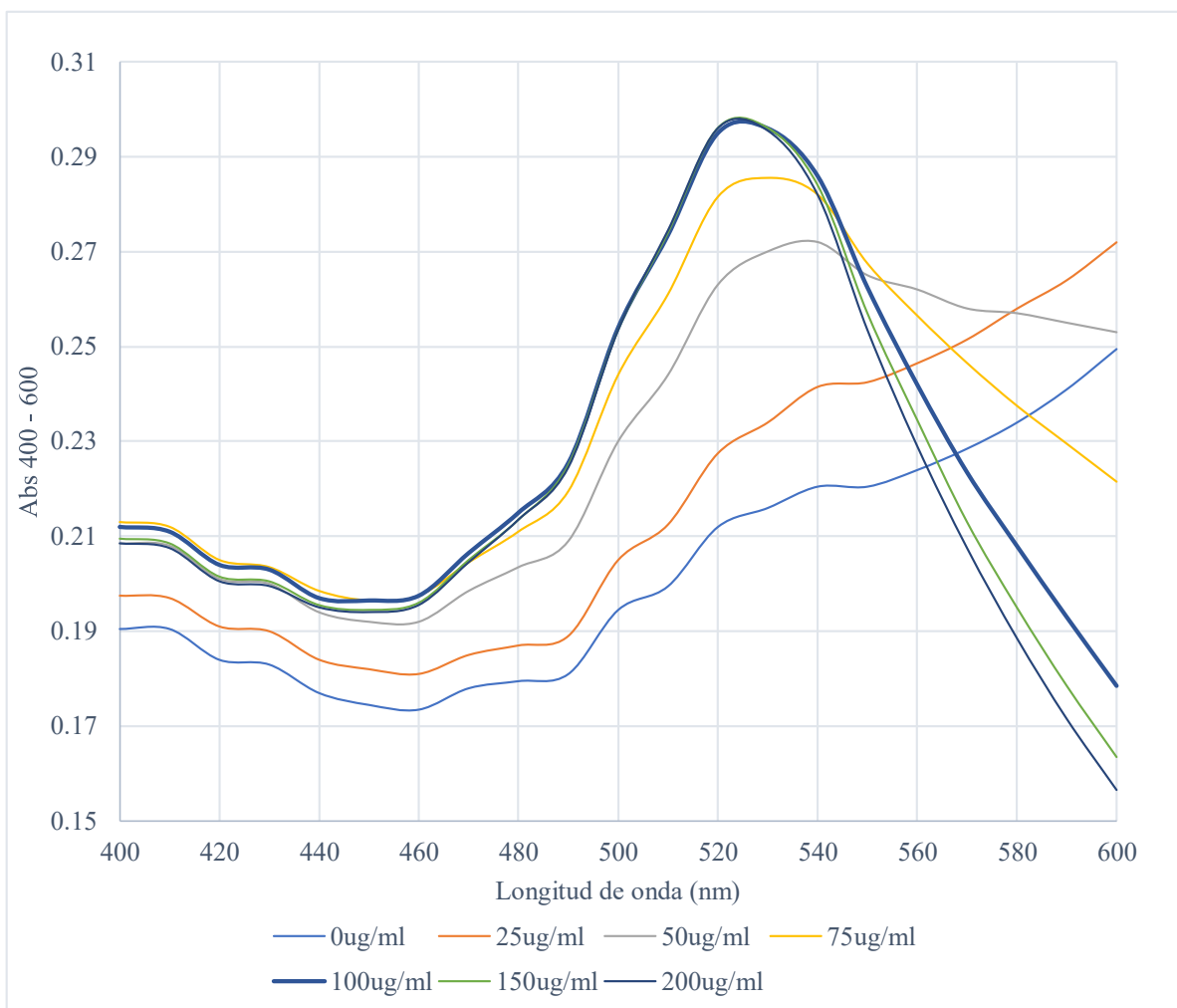


Figura 11. Efecto de la concentración del anticuerpo monoclonal IgM en la adsorción a NpAu medido por espectrometría de UV-visible con rangos de 400 a 600 nm e intervalos de 10 nm.

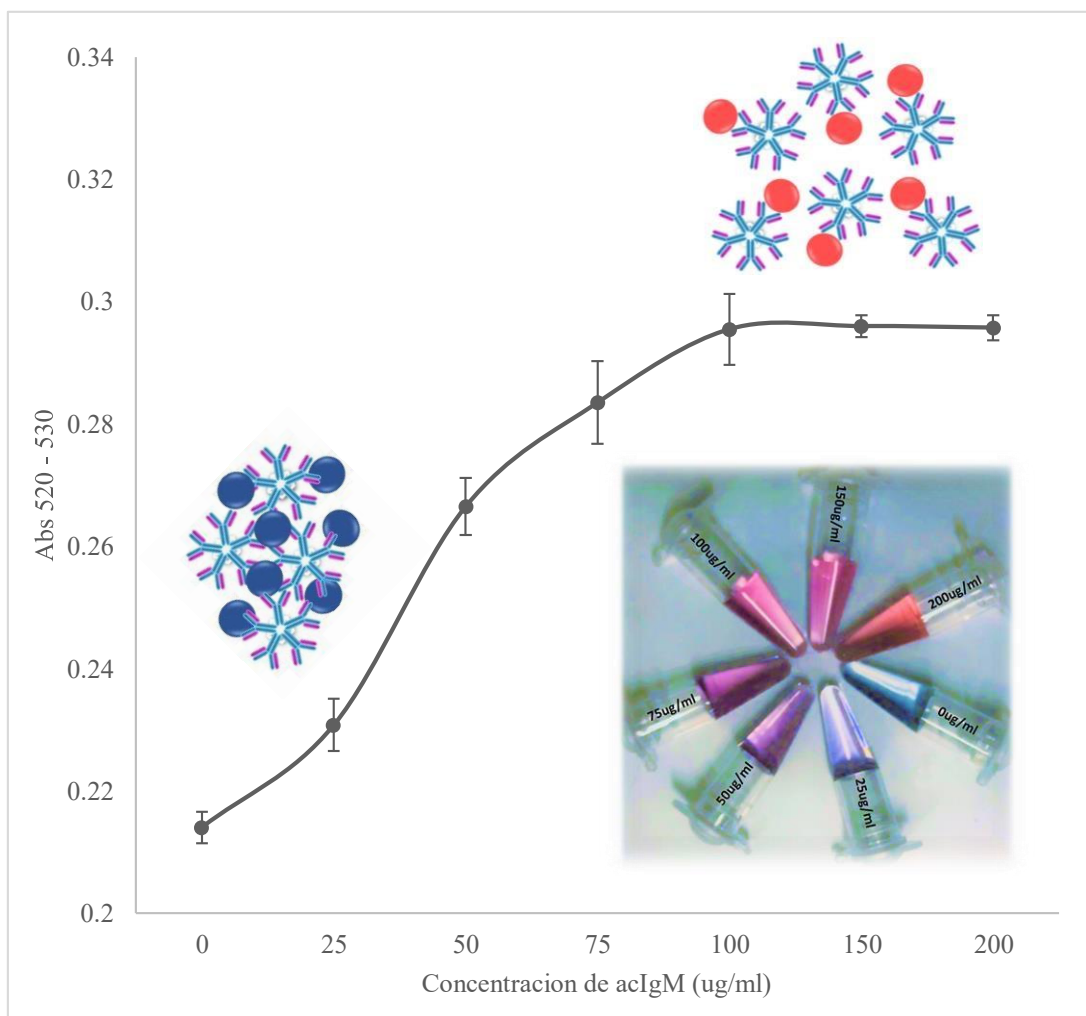


Figura 12. Gráfico de la saturación de la superficie de NpAu con anticuerpo monoclonal IgM.

El citrato de sodio juega un papel importante en la síntesis de NpAu al convertir los iones de oro (Au^{3+}) a átomos de oro (Au^0), y actuar como un agente protector que estabiliza la formación de NPsAu, evitando la agregación vía repulsión electrostática (Kimling *et al.*, 2006). No hay información concisa sobre la adsorción de anticuerpos IgM sobre NpAu, pero se ha sugerido varias teorías, como la introducción de una carga opuesta en el ligando deseado, formando fuerzas de van der Waals, puentes de hidrogeno, enlaces de tiol con el oro (a partir de residuos de cisteína del anticuerpo), o interacción hidrofóbica. Sin embargo, cuando se altera el pH cercano

al punto isoeléctrico (pI) de la NpAu, se reduce la repulsión electrostática formando uniones no covalentes entre el anticuerpo y la NpAu (Kimling *et al.*, 2006). En este estudio, se ha investigado si el pH tiene algún efecto en la adsorción del anticuerpo sobre la NpAu. La figura 13, muestra que a diferentes pH 7, 8 o 9 el proceso de adsorción del mIgM en la NpAu no tiene efecto en la integridad de la NpAu, lo que indica que el rango de adsorción vendría desde 7 a 9.

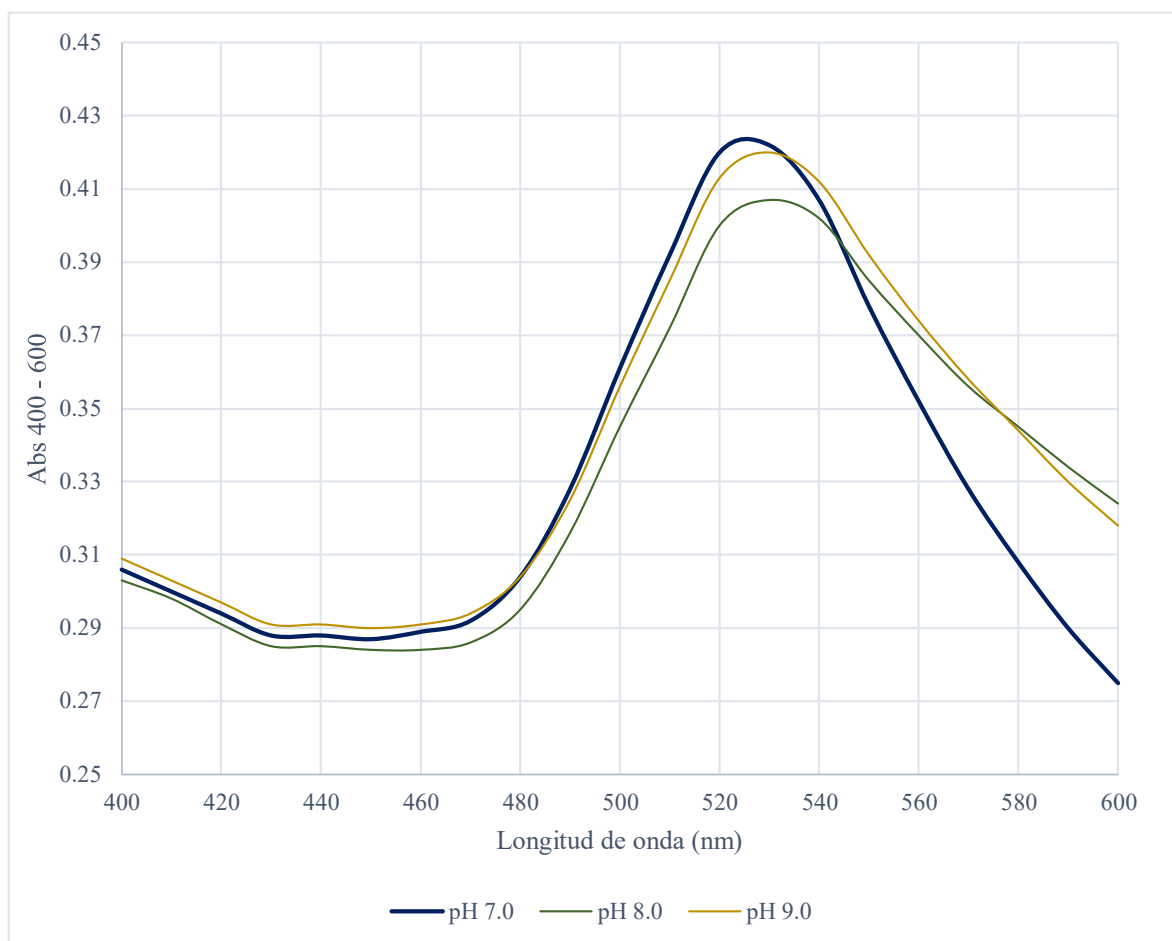


Figura 13. Efecto del pH en la adsorción del anticuerpo monoclonal IgM a la NpAu medido por espectrometría de UV-visible con rangos de 400 a 600 nm e intervalos de 10 nm.

6.4. Validación de la prueba rápida en muestras de orina

La prueba rápida fue evaluada con respecto al Límite de Detección (Siglas en ingles LOD) y al Límite de cuantificación (Siglas en inglés LOQ). Una de las múltiples ventajas de usar una prueba rápida construida en papel es la visualización a simple vista de la línea de control o línea de prueba. La figura 14, muestra una curva de calibración en orina humana con un rango de 20 a 500 ng/ml del antígeno somático de *T. solium*. A simple vista se observa que la línea de control (LC) mantiene la coloración, indicando funcionalidad de la prueba. También se observa que la línea de prueba (LP) disminuye de intensidad conforme la concentración de antígeno disminuye. La figura 15, muestra que la curva de calibración en orina humana es logarítmica en un rango de 20 a 500 ng/ml. La ecuación de regresión fue $y = 0.1343\ln(x) - 0.0509$ ($r^2=0.997$) y el coeficiente de correlación fue 0.998. El LOD y el LOQ para la prueba rápida en orina humana fue 2.87 ng/ml y 3.02 ng/ml respectivamente.

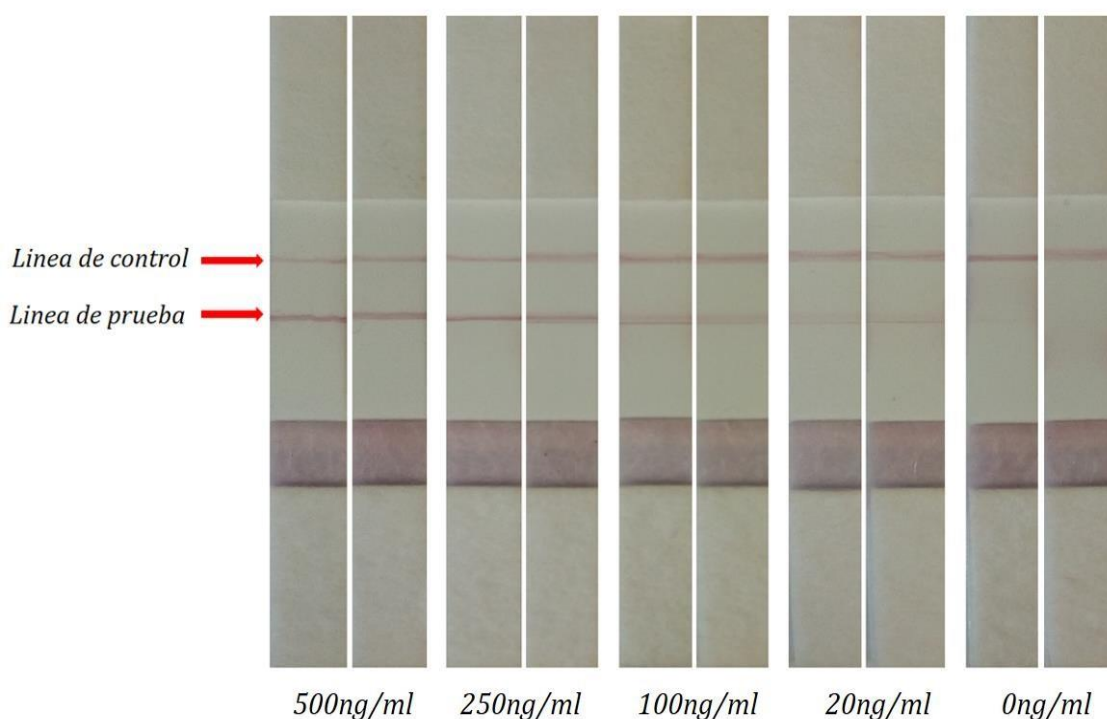


Figura 14. Curva de calibración del antígeno somático desde 0 a 500 ng/ml en pool de orina de personas sanas (n=5).

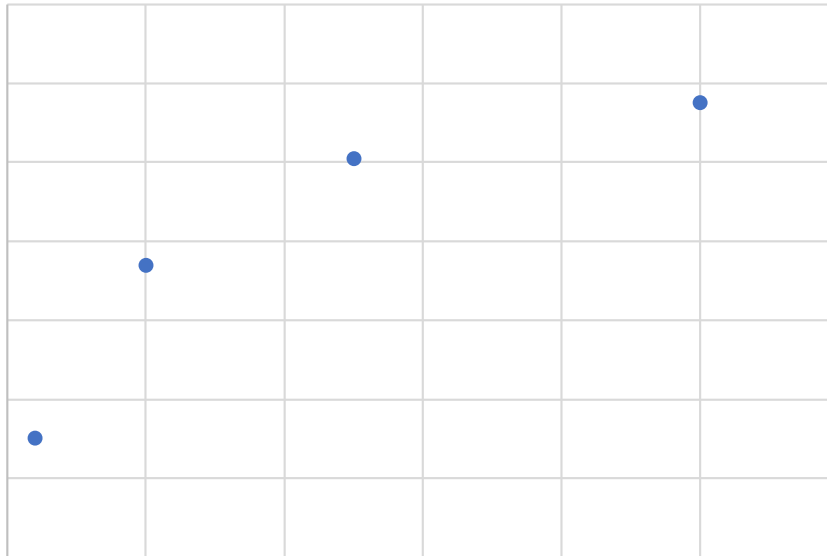


Figura 15. Curva de calibración en orina humana utilizando la prueba rápida.

*Se utilizó 5 puntos en la curva de calibrado del antígeno somático de *T. solium*: 0 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml y 500 ng/ml.*

No se ha reportado ensayos de prueba rápida en orina humana para el diagnóstico de neurocisticercosis humana. Sin embargo, existe reportes que demuestran la efectividad de detección de antígeno en orina humana en pacientes con neurocisticercosis, utilizando el ensayo de ELISA (Castillo et al., 2009).

En este trabajo se consideró el ensayo de ELISA como una prueba control para realizar una comparativa con la prueba rápida que se desarrolló. La figura 16, muestra la curva de calibración en orina humana utilizando un ensayo de ELISA. La curva de calibración en orina humana fue también logarítmica en un rango de 50 a 700 ng/ml. La ecuación de regresión fue $y = 0.5845\ln(x) - 1.3465$ ($r^2=0.993$) y el coeficiente de correlación fue 0.994. El LOD y el LOQ para el ensayo de ELISA fue

11.87 ng/ml y 12.71 ng/ml respectivamente. Estos resultados iniciales demuestran que la prueba rápida tiene una sensibilidad 4.3 veces superior a un ensayo de ELISA.

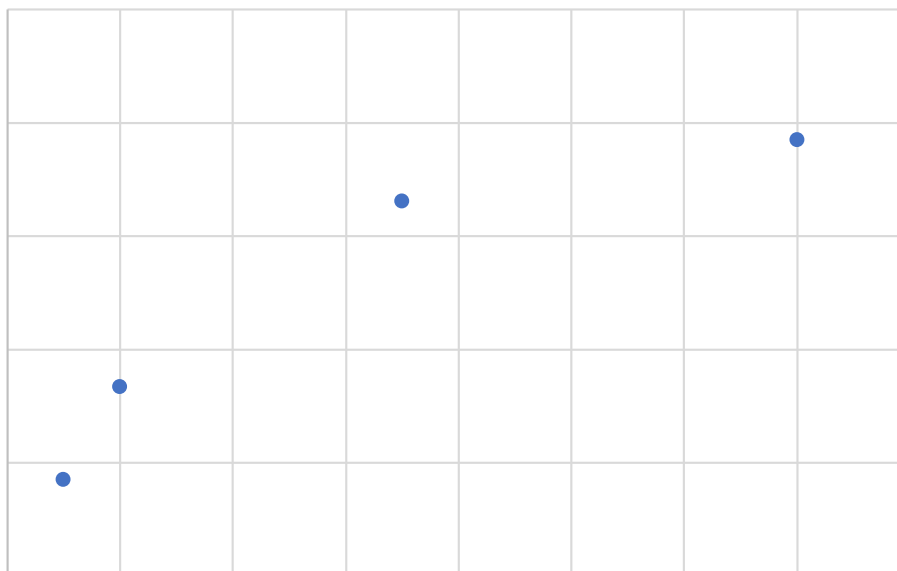


Figura 16. Curva de calibración en orina humana utilizando el ensayo de ELISA.

*Se utilizó 5 puntos en la curva de calibrado del antígeno somático de *T. solium*: 0 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 350 ng/ml y 700 ng/ml.*

También se evaluó la dilución adecuada de la orina para ser usada en la prueba rápida, para ello se utilizó un pool de orina de pacientes con diagnóstico de neurocisticercosis, y se realizó 5 diluciones de 1/2, 1/4, 1/8, 1/100 y 1/400. De la muestra de orina diluida se agregó 150 µl a la membrana de adsorción, y se incubó 5 minutos, pasado el tiempo se agregó 50 µl de PBS-Tween 0.05% directamente a la fibra de vidrio con el fin de eliminar uniones inespecíficas en la nitrocelulosa. El tiempo promedio que se necesita para la reacción fue de 10 a 15 minutos. La figura 17, muestra la intensidad de reacción de la línea de prueba a diferentes diluciones

del pool de orina. La intensidad de línea de prueba y la línea de control se cuantificó con el lector colorimétrico, model ESE Quant Lateral Flow reader, y para graficar los resultados en la curva de dilución, se obtuvo la proporción entre la línea de prueba/línea de control (ratio LP/LC).

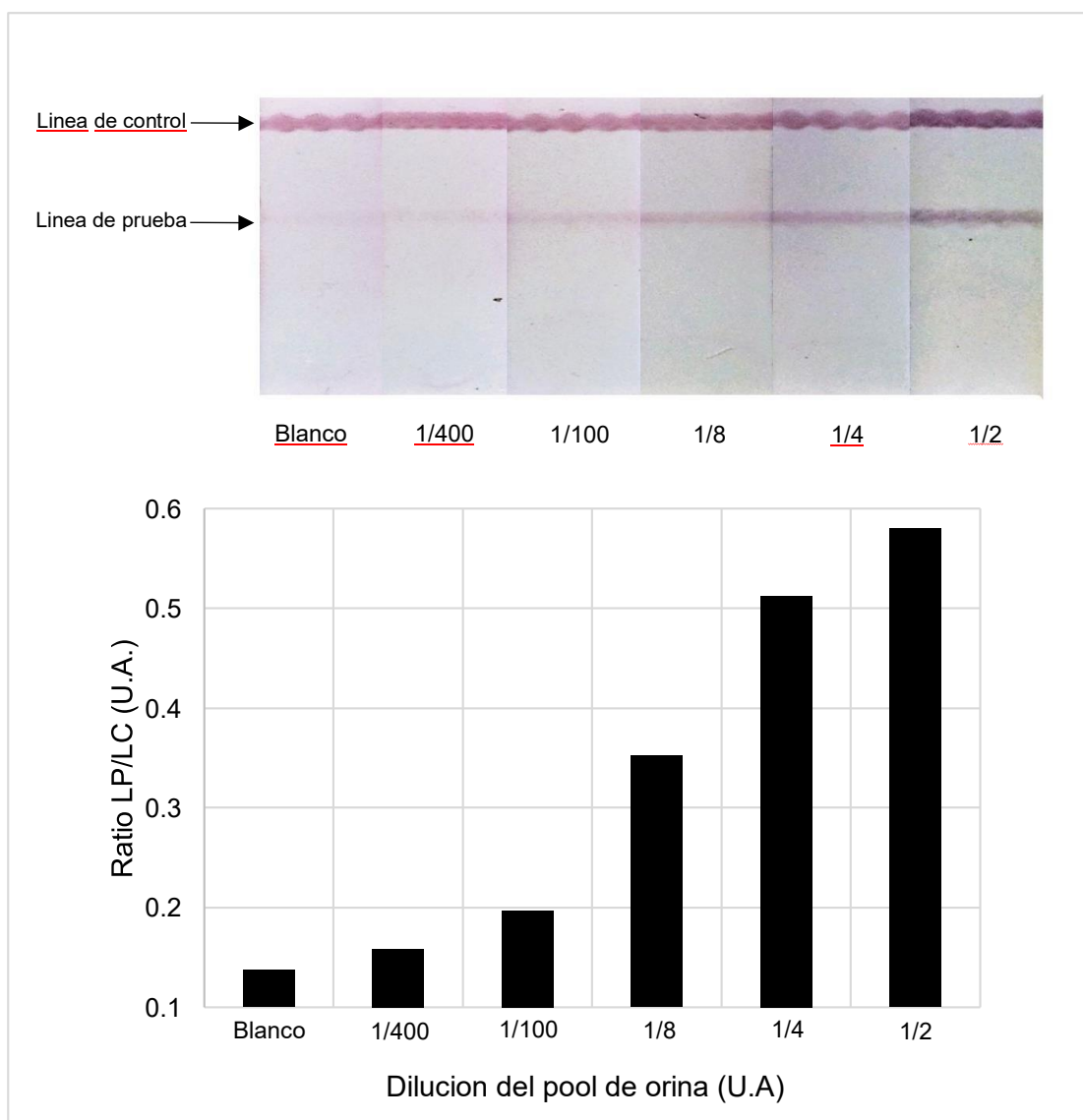


Figura 17. Curva de dilución del pool de orina humana de pacientes con neurocisticercosis usando la prueba rápida.

También se realizó una curva de dilución del pool de orina de pacientes con diagnóstico de neurocisticercosis y se evaluó por el ensayo de ELISA. Se utilizó 7

diluciones desde 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/32, 1/256, 1/512. La figura 18, muestra la intensidad del color a diferentes diluciones del pool de orina. La intensidad del color se cuantificó por espectrofotometría de UV-visible, las absorbancias se expresaron por densidad óptica a 450 nm.

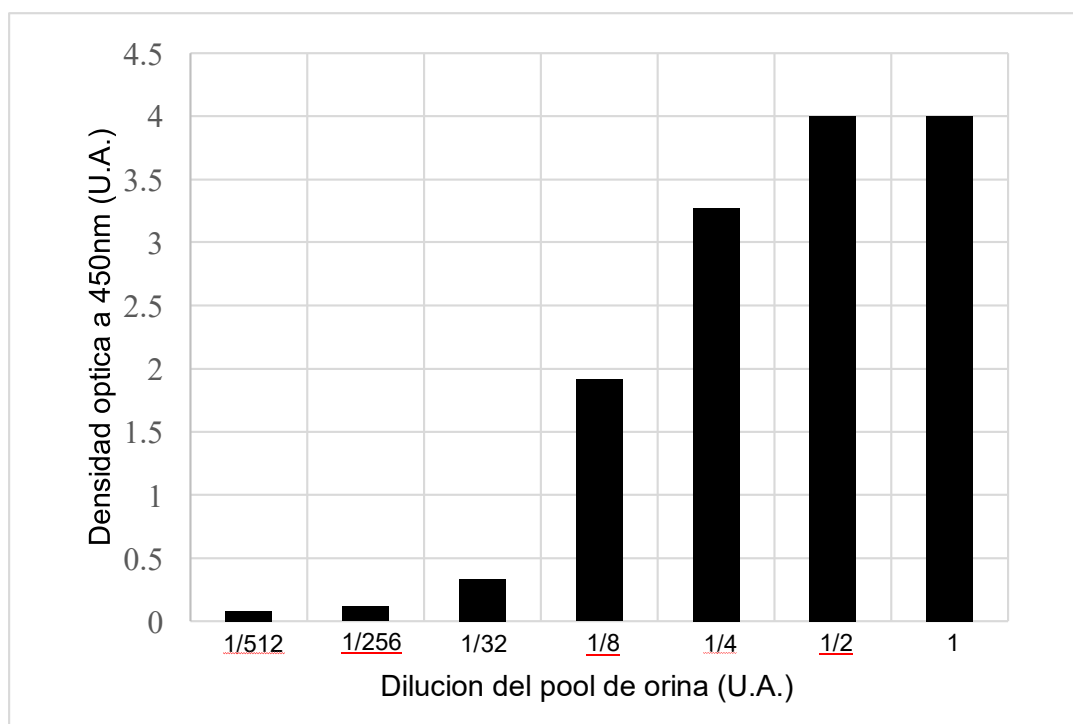


Figura 18. Curva de dilución del pool de orina humana de pacientes con neurocisticercosis usando el ensayo de ELISA.

Los resultados muestran que el rango de dilución de la muestra de orina para ser usado en una prueba rápida puede ser de 1/2 a 1/8, con este rango es posible visualizar adecuadamente la LC y LP. El ensayo de ELISA corroboró que un rango de dilución de 1/2 a 1/8 funciona adecuadamente en la detección de antígeno de *T. solium* en muestra de orina (figura18).

La sensibilidad y especificidad se determinó utilizando la curva ROC, programa graphpad prism versión 8. Se analizó 13 pacientes con NCC 2 a más quistes cerebral del estadio larval de *T. solium*, 12 pacientes con NCC subaracnoidea, y 12 personas control negativo a NCC. Los resultados del análisis de la prueba rápida se compararon con resultados del ensayo de ELISA proporcionados por el Laboratorio de Inmunología parasitaria del LIEI de la UPCH, y es parte de la tesis de la Bachiller

Yesica Santos. El análisis fue dividido en 2 grupos, el primer grupo incluye a pacientes con NCC de 2 a más quistes y el segundo grupo a pacientes con NCC subaracnoidea.

El análisis del primer grupo se enfocó a pacientes con NCC de 2 a más quistes. La tabla 4, muestra el análisis bajo la curva ROC de la prueba rápida comparado con el ensayo de ELISA. La prueba rápida presenta un área de 0.888, con un intervalo de confianza que no contiene al 0.5, una $p=0.001$, una sensibilidad del 84.64% y especificidad del 100%, estos datos se corroboran con una curva muy cercana al extremo superior (figura 19). Para el caso del ensayo de ELISA presenta un área de 0.865, una sensibilidad del 76.92% y una especificidad del 100%, y la curva también es cercana al extremo superior (figura 20).

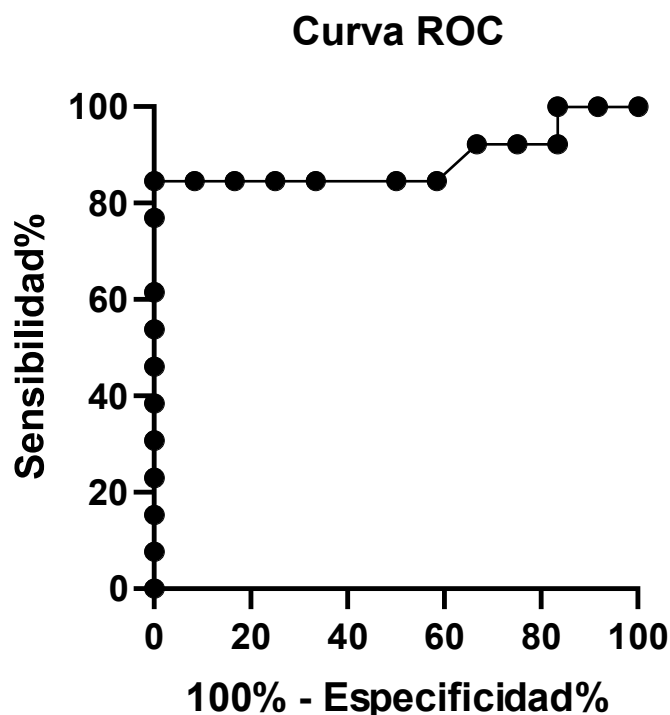


Figura 19. Curva ROC. Evaluación de la prueba rápida en pacientes que presentan 2 a más quistes. Los datos de confirmación de pacientes que presentan 2 a más quistes fueron proporcionados por la Unidad de Cisticercosis del Instituto Nacional De Ciencias Neurológicas - Hospital Santo Toribio de Mogrovejo.

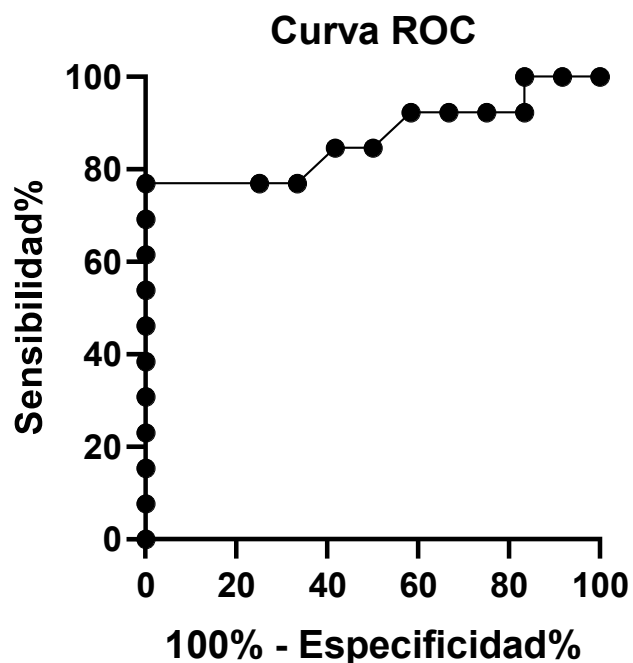


Figura 20. Curva ROC. Evaluación del ensayo de ELISA en pacientes que presentan 2 a más quistes. Los datos de confirmación de pacientes que presentan 2 a más quistes fueron proporcionados por la Unidad de Cisticercosis del Instituto Nacional De Ciencias Neurológicas - Hospital Santo Toribio de Mogrovejo.

Tabla 4. Área bajo la curva ROC. Evaluación de la prueba rápida comparado con el ensayo de ELISA en pacientes con NCC que presentan 2 a más quistes.

Variable	Área	Error estándar	Significación	Límite de confianza 95%		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
				Límite inferior	Límite superior		
Prueba rápida	0.888	0.077	0.001	0.737	1.000	84.64	100
Ensayo de Elisa	0.865	0.079	0.002	0.712	1.000	76.92	100

Los resultados reportados para este primer análisis demuestran que en pacientes con 2 a más quistes cerebrales la prueba rápida es más sensible (84.64%) que el

ensayo ELISA (76.92%). La mayoría de pruebas rápidas para el diagnóstico de NCC están enfocados en la detección de anticuerpos en suero humano, Handali *et al.*, 2010 y Corstjens *et al.*, 2014, desarrollaron una prueba inmunocromatográfica con una sensibilidad robusta del 93.9% y 96% respectivamente, que es útil para la detección de anticuerpos en suero humano. Con frecuencia los anticuerpos han sido reportados en población asintomática de regiones endémicas, lo que sugiere que los anticuerpos pueden persistir aun después de que el parásito haya sido eliminado. Por consiguiente, su presencia es indicador de exposición al parásito y no infección viable, como es el caso de la detección de antígeno circulante (Parija *et al.*, 2014; Garcia *et al.*, 2014). Por otro lado, el encontrar una sensibilidad de 84.64%, inferior a la reportada por Corstjens *et al.*, 96%, tiene una explicación basada en que la cantidad de antígeno liberado en la orina es intermitente, a diferencia del suero donde la cantidad de anticuerpo es constante.

Biswas *et al.*, 2013 y Parija *et al.*, 2004, desarrollaron una prueba rápida de aglutinación en látex (LAT) con una sensibilidad del 58.3% y 62.5% respectivamente en muestras de orina para la detección de antígeno en pacientes con NCC. La prueba LAT usa un anticuerpo unido a partículas de látex, que cuando entran en contacto con el antígeno presente en la muestra se aglutina (González-Losada C *et al.*, 2018). Nuestro estudio es el primer reporte de una prueba rápida para detección de antígenos en orina humana de pacientes con NCC de 2 a más quistes con una sensibilidad del 84.64%, superior a la prueba LAT (58.3% - 62.5%). Esta diferencia podría deberse a que la prueba rápida usa dos anticuerpos monoclonales a diferencia de un anticuerpo como en la prueba LAT, lo que permite amplificar la señal y mejorar la sensibilidad. Además, el pequeño tamaño de las nanopartículas de oro (~17nm) a diferencia de partículas de látex, permiten controlar la cantidad de anticuerpos que se adsorbe por nanopartícula. Por consiguiente, los resultados antes mencionados demuestran que el uso de dos anticuerpos monoclonales acoplados a nanopartículas de oro puede incrementar la sensibilidad de una prueba rápida hasta en un 20% en pacientes con NCC de 2 a más quistes.

El análisis para el segundo grupo se enfocó en pacientes con NCC subaracnoidea. La tabla 5, muestra que la prueba rápida presenta un área de 0.757, $p=0.033$, y una sensibilidad del 41.67% y especificidad del 100%, la curva está ligeramente ubicada al extremo superior izquierdo (figura 21). El análisis del ensayo de ELISA muestra una sensibilidad del 91% (figura 22).

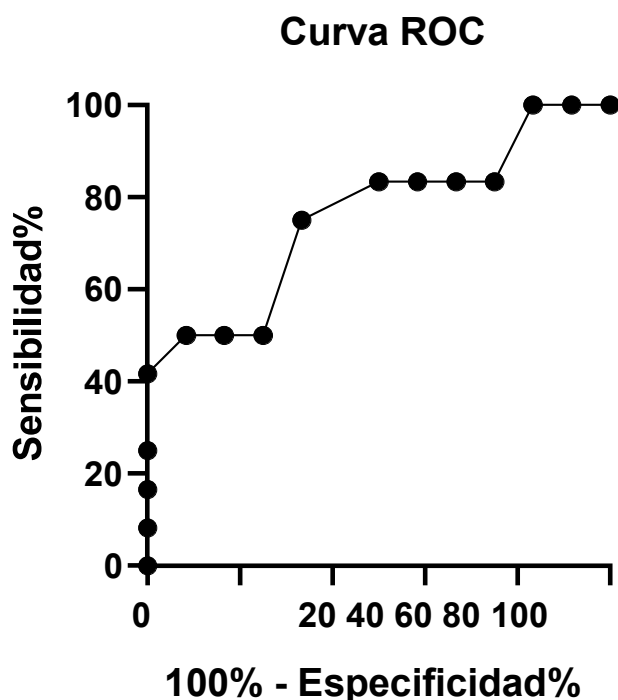


Figura 21. Curva ROC. Evaluación de la prueba rápida en pacientes con NCC subaracnoidea. Los datos de confirmación de pacientes con NCC subaracnoidea fueron proporcionados por la Unidad de Cisticercosis del Instituto Nacional De Ciencias Neurológicas - Hospital Santo Toribio de Mogrovejo.

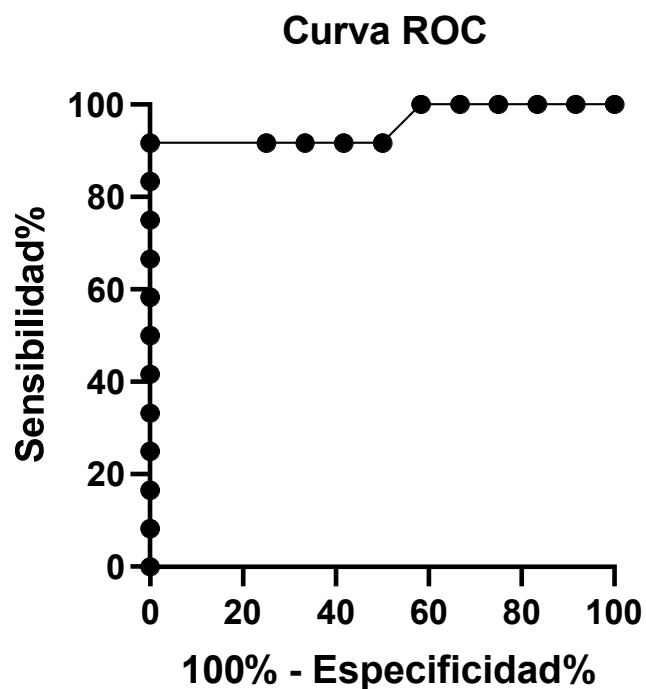


Figura 22. Curva ROC. Evaluación del ensayo de ELISA en pacientes con NCC subaracnoidea. Los datos de confirmación de pacientes con NCC subaracnoidea fueron proporcionados por la Unidad de Cisticercosis del Instituto Nacional De Ciencias Neurológicas - Hospital Santo Toribio de Mogrovejo.

Tabla 5. Área bajo la curva ROC. Evaluación de la prueba rápida comparado con el ensayo de ELISA en pacientes con NCC subaracnoidea.

Variable	Área	Error estándar	Significación	Límite de confianza 95%		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
				Límite inferior	Límite superior		
Prueba rápida	0.757	0.101	0.033	0.559	0.954	41.67	100
Ensayo de Elisa	0.954	0.046	0.000	0.864	1.000	91.67	100

Los poros de la membrana de nitrocelulosa permiten el flujo de moléculas hasta de 1500 kDa. Sin embargo, creemos que cuando la cantidad de antígeno en la muestra es alta, la superficie de la NpAu se sobresatura lo que ocasiona que su migración afecte la sensibilidad de la prueba. Esta hipótesis, se ve reflejada en el análisis de los 2 grupos de pacientes. La cantidad de antígeno circulante en pacientes con NCC de 2 a más quistes no es elevada, esto permite una interacción en 3D del antígeno con el anticuerpo IgM obteniendo una sensibilidad del 84.64% (tabla 4). Por el contrario, los pacientes con NCC subaracnoidea se caracterizan por tener una alta cantidad de cisticercos cerebrales, lo que se traduce en una alta cantidad de antígeno circulante en fluidos biológicos. La elevada cantidad de antígeno dificulta la interacción antígeno-anticuerpo IgM, que perjudica la migración de las NpAu, y se traduce en una disminución de la sensibilidad a 41.67% (tabla 5). Por consiguiente, una prueba rápida se mueve en función de la cantidad de antígeno circulante, una elevada cantidad de antígeno afecta la sensibilidad, y una cantidad de antígeno moderada, mejora la sensibilidad de la prueba.

Es curioso observar que el ensayo de ELISA en paciente con NCC subaracnoidea tiene una sensibilidad de 91.67% (tabla 5), superior al ensayo en pacientes con 2 a más quistes de 76.92% (tabla 4). Creemos que la respuesta está en el diseño de la plataforma. La prueba rápida tiene un diseño tridimensional que permite la interacción en 3D de la NpAu con el antígeno en la muestra, si hay un excedente de antígeno en la muestra formará aglomerados con la NpAu. Por el contrario, un ensayo de ELISA tiene un diseño estático, el anticuerpo se fija en la placa y toda la reacción es estática, si hay un excedente de antígeno en la muestra estos se eliminan con los lavados que existen en cada paso. Por ende, la sensibilidad de la prueba en un ensayo de ELISA se verá afectado solo en pacientes con baja cantidad de antígeno (tabla 4).

A diferencia de un ensayo de ELISA, la prueba rápida es de fácil elaboración y no requiere de un laboratorio ampliamente equipado, por ende, puede ser empleado para monitorear pacientes que estén siguiendo un tratamiento o para estudios

epidemiológicos de descarte en zonas de bajo recurso, donde no se cuenta laboratorio equipados.

6.5. Resultados adicionales

Los anticuerpos IgM interaccionan con la NpAu a través de la carga negativa del ligando citrato (Zhang *et al.*, 2014), y tienen un tamaño ~35 nm de diámetro (Saber *et al.*, 2011). El tamaño de una NpAu ~17 nm permite la adsorción de 2 a 3 IgM/partícula. Por el contrario, un anticuerpo IgG tiene un tamaño ~10 nm de diámetro (Saber *et al.*, 2011), lo que permite la adsorción de 8 a 10 IgG/partícula. La figura 22, muestra la señal de la prueba rápida en relación a la cantidad de analito capturado por partícula. Figura 22.a, indica que la IgM por NpAu individual captura una mínima cantidad de analito en la muestra. Es decir, no se requiere una alta concentración de analito en la muestra para emitir una señal. Por el contrario, la IgG por NpAu individual necesitan mayor requerimiento de analito en la muestra para emitir señal visual (Figura 22.b).

En el presente estudio y como parte de un complemento, evaluamos la teoría de que el anticuerpo IgM tiene un mejor uso que el anticuerpo IgG en muestras donde la concentración del analito problema es baja. Para ello, se ha fragmentado el anticuerpo IgM en fragmentos de IgM (IgMs). Los IgMs son producidos por reducción y alquilación, mediante el uso de cisteína como agente reductor (Andrew *et al.*, 2001), y tienen una estructura y tamaño similar a un anticuerpo IgG. La figura 23, muestra la purificación de los IgMs mediante cromatografía de exclusión molecular (*siglas en inglés*, SEC), se ha purificado los dos tipos de IgMs proveniente de TsW8 y TsW5, y se colectó los tres picos más altos. Se realizó un SDS-PAGE con tinción por TGX y se observó que en el tercer pico se puede visualizar la cadena pesada de 75 kDa y cadena ligera 25 kDa correspondiente a un modelo similar de IgG (Figura 24).

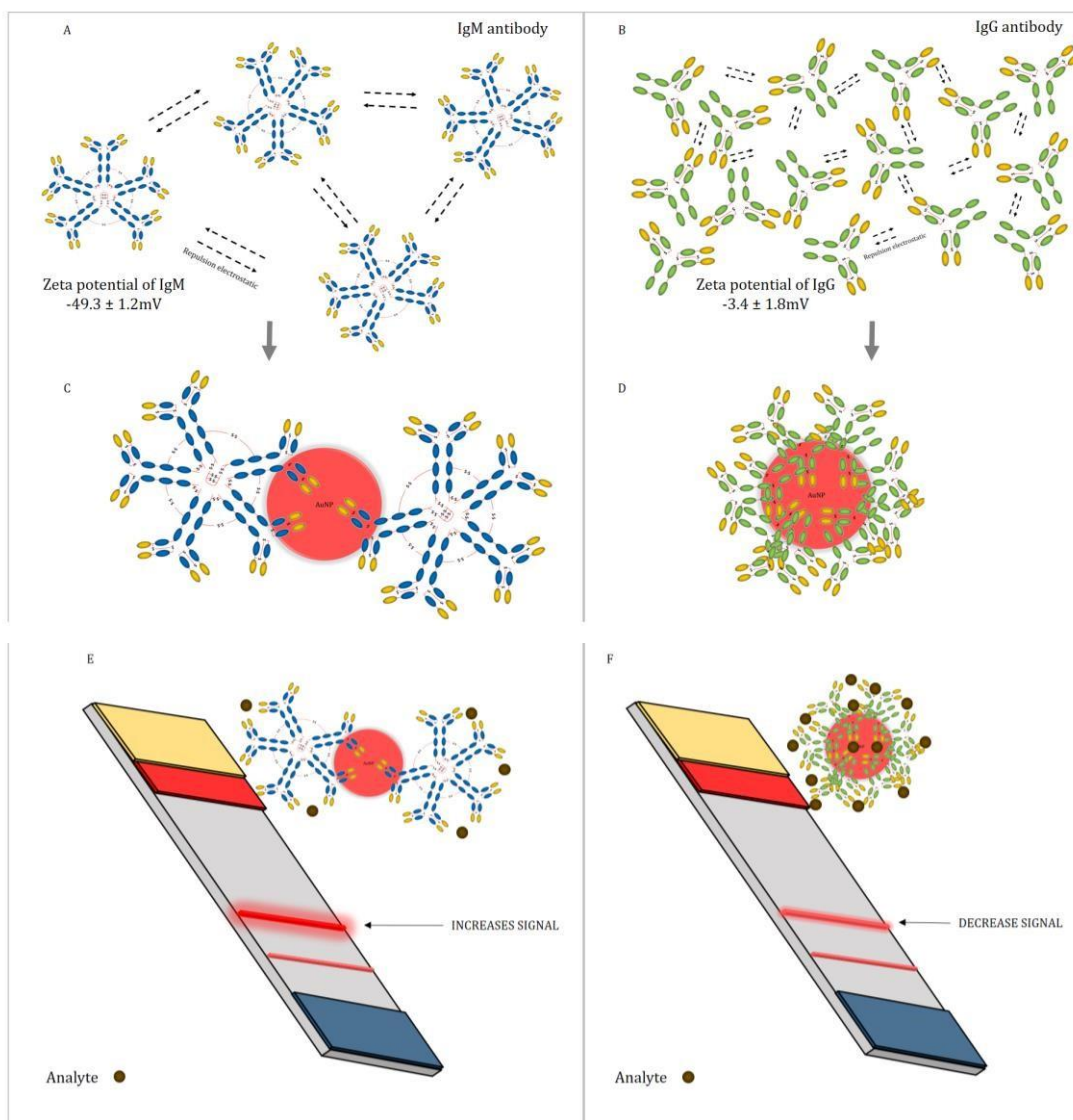


Figura 23. Teoría de la señal de reacción de una prueba rápida, correspondiente a la cantidad de analito capturado por el anticuerpo/partícula. A y B. Simulación de adsorción considerando el tamaño de las IgM e IgG respectivamente. También muestra la captura de analito por NpAu individual.

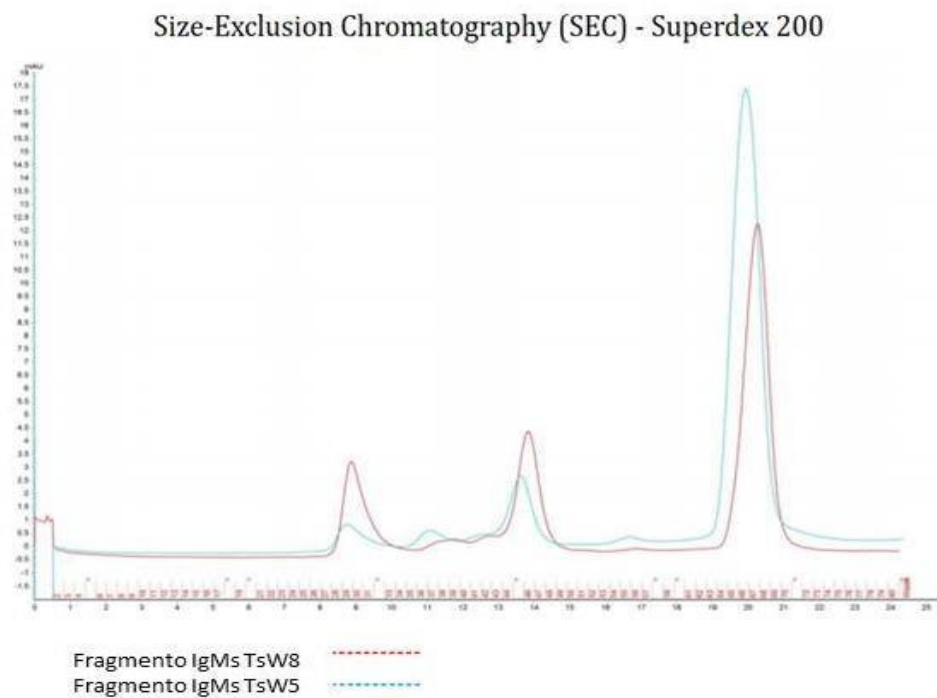


Figura 24. Purificación de los fragmentos de IgMs mediante cromatografía de exclusión molecular (siglas en inglés, SEC).

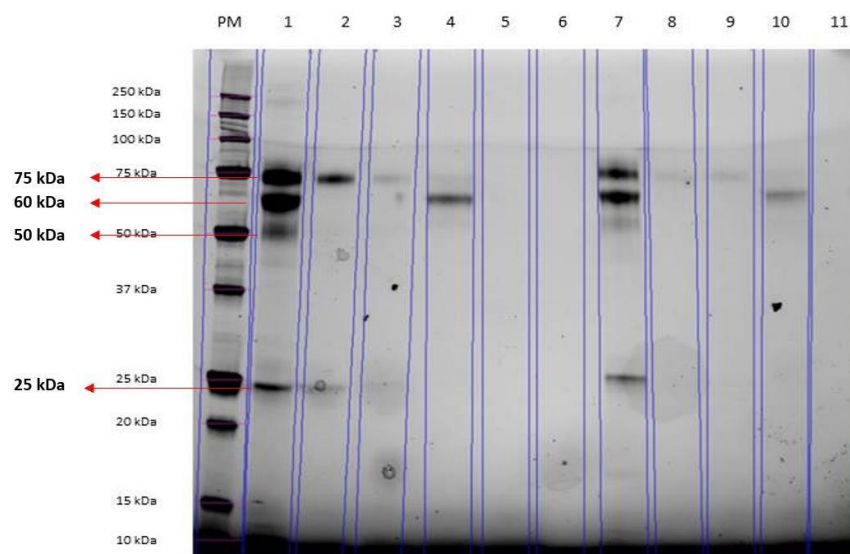


Figura 25. Tinción por TGX después del SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio) al 10%.

PM: Marcador de peso molecular en kDa (Precision Plus Protein, Bio-Rad). Canal 1 y 7: Anticuerpo IgM antes de la fragmentación, isotipos TsW5 y TsW8 respectivamente. Canal 2 y 8: tercer pico de la purificación por exclusión molecular, IgMs TsW5 y TsW8 respectivamente, se observa la cadena pesada de 75 kDa y cadena ligera 25 kDa correspondiente a modelo similar de IgG. Canal 3 y 9: Segundo pico de la purificación por exclusión molecular. Canal 4 y 10: Primer pico de la purificación por exclusión molecular, son correspondientes a los primeros fragmentos de la purificación. Canal 5, 6 y 11: Muestra en blanco.

Se determinó la constante de asociación, K_a (1/Ms) del IgMs y el IgM sin fragmentar con respecto al antígeno excretado/secretado de *T. solium*. La figura 25, muestra que la K_a del IgMs es 2.72, y la K_a del IgM sin fragmentar es 5.72. Estos resultados previos indican que los IgM sin fragmentar son más estables al mantenerse unidos al antígeno excretado/secretado de *T. solium*.

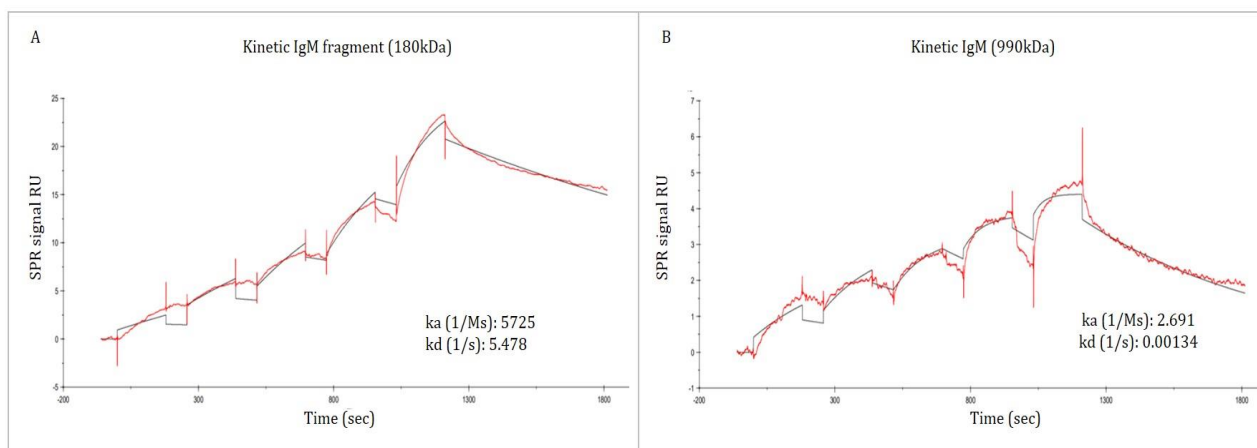


Figura 26. Constante de asociación determinado por Superficie Plasmonica de Resonancia (SPR). a. Cinética del IgMs fragmentado. b. Cinética del IgM sin fragmentar.

Finalmente, se determinó que el límite de detección de los IgMs es 32 ng/ml, y de los IgM sin fragmentar es 10 ng/ml, ello demuestra que el IgM es capaz de detectar hasta cantidades mínimas del analito (Figura 26). Estos resultados alentadores demuestran que el anticuerpo IgM a diferencia del IgG podría ser un buen candidato para formatos de ensayo donde se use muestras con escasa cantidad de antígeno.

Sin embargo, para reportar la efectividad de las IgM, es necesario realizar pruebas adicionales como ensayos en una prueba rápido y un ensayo de ELISA.

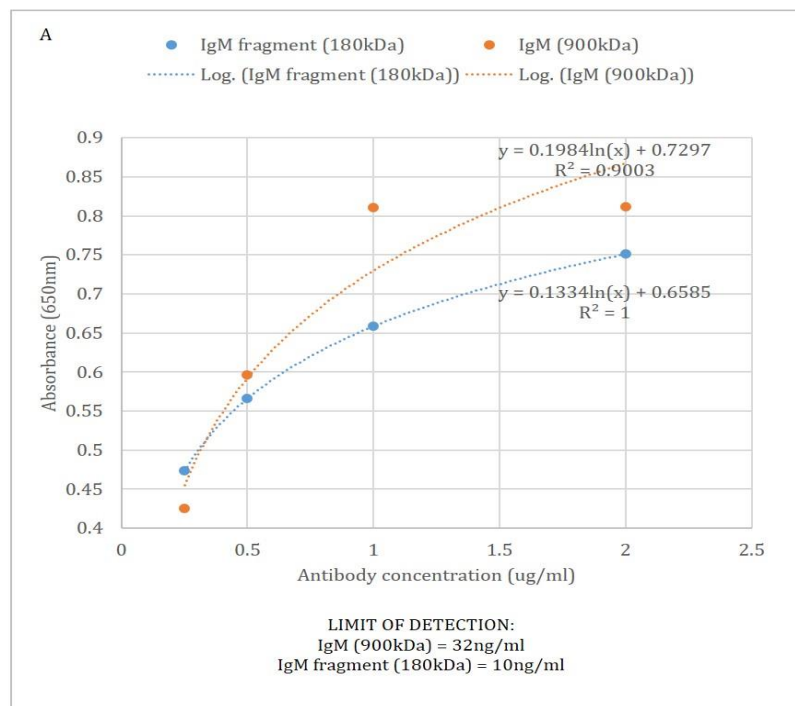


Figura 27. Límite de detección del anticuerpo IgM y fragmento de IgMs.

7. CONCLUSIONES

1. El uso de partículas magnéticas acopladas a proteína L permiten la purificación de anticuerpos monoclonales tipo IgM con un alto grado de pureza. Las partículas pueden ser reutilizadas sin afectar su rendimiento. El proceso no requiere pasos de pre concentración, lo que disminuye el proceso de manipulación y evita la desnaturalización del anticuerpo. El uso de partículas no requiere de un laboratorio equipado, lo que lo convierte en una técnica que puede ser adaptado a cualquier laboratorio.
2. La síntesis de nanopartículas de oro de forma esférica mediante la reducción del citrato es estable hasta por 3 meses sin mostrar procesos de aglomeración en picos de absorción a 520nm.
3. Moléculas de gran tamaño como el anticuerpo IgM se adsorben en nanopartículas de oro sin afectar su carga superficial. Soluciones que presenten concentraciones elevadas de sal no tienen efecto en la superficie de la nanopartículas que este correctamente apantalladas con el anticuerpo IgM.
4. Con una sensibilidad similar al ensayo de ELISA, su fácil elaboración, el uso amigable y la rápida detección, la prueba rápida se convierte en un prototipo de diagnóstico para ser empleado en el seguimiento de pacientes con tratamiento y estudios epidemiológicos de zonas donde no se cuenten con laboratorios altamente equipados.

8. RECOMENDACIONES

1. Para ampliar el rango de pH óptimo de unión, se recomienda considerar no solo el punto isoeléctrico de la nanopartícula de oro, sino también del anticuerpo que se adsorberá.
2. En el proceso de adsorción del anticuerpo en la nanopartícula de oro, se recomienda utilizar una solución similar al de la muestra biológica que será utilizada en la técnica estandarizada.
3. Se recomienda que la prueba rápida sea empleada en muestras donde la cantidad de antígeno no sea elevada. Si el caso fuera lo contrario, es mejor probar varias dimensiones del poro de la nitrocelulosa.
4. Si la prueba rápida se decide emplear en zonas con laboratorios poco equipados, se recomienda evaluar condiciones de almacenamiento y tiempo de vida media.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrew SM, Titus JA. Fragmentation of immunoglobulin M. Curr Protoc Immunol. 2001 May;Chapter 2:Unit 2.10A.

Bahadir EB, Sezginturk MK. Lateral flow Assay: Principles, designs and labels. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2016 sep;82:286-306.

Biswas R, Parija SC. Latex agglutination test for the detection of cysticercus antigen in the urine for the diagnosis of neurocysticercosis. Trop Parasitol. 2013 Jul;3(2):168-9.

Castillo Y, Rodriguez S, García HH, Brandt J, Van Hul A, Silva M, RodriguezHidalgo R; Cysticercosis Working Group in Perú. Urine antigen detection for the diagnosis of human neurocysticercosis. Am J Trop Med Hyg. 2009 Mar;80(3):379-83.

Corstjens PL, de Dood CJ, Priest JW, Tanke HJ, Handali S; Cysticercosis Working Group in Peru. Feasibility of a lateral flow test for neurocysticercosis using novel up-converting nanomaterials and a lightweight strip analyzer. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Jul 3;8(7):e2944.

Costa MN, Veigas B, Jacob JM, Santos DS, Gomes J, Baptista PV, et al. A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper. Nanotechnology. 2014; 25:094006.

Chevallet M, Diemer H, Van Dorssealer A, Villiers C, Rabilloud T. Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome. Proteomics. 2007 Jun;7(11):1757-70.

Del Brutto OH. Neurocysticercosis: up-dating in diagnosis and treatment. Neurologia. 2005 Oct;20(8):412-8.

Del Brutto OH, Garcia HH. Neurocysticercosis. Handb Clin Neurol. 2013; 114: 313–25.

Dimubanzi PC, Carabin H, Budke CM, Nguyen H, Qian YJ, Rainwater E, Dickey M, Reynolds S, Stoner JA. A systematic review of the frequency of neurocysticercosis with a focus on people with epilepsy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4: e870.

Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticle for biomedicine. *Chem Soc Rev*. 2012 Apr 7;41(7):2740-79.

Dzantiev BB, Byzova NA, Urusov AE, Zherdev AV. Immunochromatographic methods in food analysis. *Trends Anal. Chem*. 2014;55:81-93.

Fleury A, Hernández M, Fragoso R, Parkhouse R, Harrison L, Sciutto E. Detection of secreted cysticercal antigen: a useful tool in the diagnosis of inflammatory neurocysticercosis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 97, Issue 5, September-October 2003, Pages 542–546.

Fleury A, Garcia E, Hernandez M, et al. Neurocysticercosis: HP10 antigen detection is useful for the follow-up of the severe patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: e2096.

Gautam S, Loh KC. Immunoglobulin M purification challenges and perspectives. *Biotechnol Adv*. 2011;29(6):840–9.

Garcia HH, Herrera G, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Diaz JF, Candy EJ, Miranda E, Naranjo J. Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. The Cysticercosis Working Group in Peru (Clinical Studies Coordination Board). *Am J Trop Med Hyg*. 1994 Feb;50(2):152-7.

Garcia HH, Parkhouse RM, Gilman RH, Montenegro T, Bernal T, Martinez SM, Gonzalez AE, Tsang VC, Harrison LJ; Cysticercosis Working Group in Peru. Serum antigen detection in the diagnosis, treatment, and follow-up of neurocysticercosis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000 Nov-Dec;94(6):673-6.

Garcia HH, Gonzales AE, Gilman RH, Palacios LG, Jimenez I, Rodriguez S, et al. Short report: transient antibody response in *Taenia solium* infection in field conditions a major contributor to high seroprevalence. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 65:31-2.

Garcia HH, Del Bruto OH. Imaging finding in neurocysticercosis. *Acta Trop*. 2003 Jun;87(1):71-8.

Garcia HH, Del Brutto OH. Neurocysticercosis: updated concepts about and old disease. *Lancet Neurol*. 2005; 4:653-61.

Garcia HH, Rodriguez S, Gilman RH, Gonzales AE, Tsang VC; Cysticercosis Working Group in Peru. Neurocysticercosis: is serology useful in the absence of brain imaging? *Trop Med Int Health*. 2012 Aug;17(8):1014-8.

Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol*. 2014 Dec;13(12):1202-15.

GE Healthcare. Affinity Chromatography Vol. 3: Specific Groups of Biomolecules. GE Healthcare Life Sciences.

Handali S, Klarman M, Gaspard AN, Dong XF, Laborde R, Noh J., et al. Development and evaluation of a magnetic immunochromatographic test to detect *Taenia solium*, which causes taeniasis and neurocysticercosis in humans. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Apr;17(4):631t-7.

Harrison E, Hamilton JWJ, Macias-Montero M, Dixon D. Peptide functionalized gold nanoparticles: the influence of pH on binding efficiency gold nanoparticles. *Nanotechnology*. 2017 Jul 21;28(29):295602.

Hober S, Nord K, Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;848(1):40–7.

Hu M, Chen J, Li ZY, Au L, Hartland GV, Li X, et al. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chem Soc Rev*. 2006 Nov;35(11):1084-94.

Hui W, Krassen D. Conjugation of immunoglobulin M to gold nanoparticle. *Current Nanoscience*. 2011 Dec 01;7(6):874-878(5).

James AE, Driskell JD. Monitoring gold nanoparticle conjugation and analysis of biomolecular binding with nanoparticle tracking analysis (NTA) and dynamic light scattering (DLS). *Analyst*. 2013 Feb 21;138(4):1212-8.

Jans H, Liu X, Austin L, Maes G, Huo Q. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies. *Anal Chem*. 2009 Nov 15;81(22):9425-32.

Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B*. 2006 Aug 17;110(32):157.

Kurien BT, Scofield RH. Accelerated Coomassie Blue staining and destaining of SDS-PAGE gels with application of heat. *Methods Mol Biol*. 2012;869:471–9.

Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods in molecular biology*. 1994;32:9–15.

Menge U, Fraune E, Lehmann J, Kula MR. Purification of proteins from cell culture supernatants. *Dev Biol Stand*. 1987;66:391-401.

Nilson BH, Lögdberg L, Kastern W, Björck L, Åkerström B. Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain. *J Immunological Methods*. 1993;164(1):33–40.

Ogarev V, Rudoi V, Dement'eva O. Gold Nanoparticles: Synthesis, Optical Properties, and Application. *Inorganic Materials: Applied Research*. 2018 Feb 27;9(1):134–140.

Paloni M, Cavallotti C. Molecular Modeling of the Interaction of Protein L with Antibodies. *ACS Omega*. 2017;2:6464–72.

Paredes A, Saenz P, Marzal MW, Orrego MA, Castillo Y, Rivera A, et al. AntiTaenia solium monoclonal antibodies for the detection of parasite antigens in

body fluids from patients with neurocysticercosis. The Cysticercosis Working Group in Peru. *Exp Parasitol*. 2016; 166:37-43.

Parija M, Biswas R, Harish BN, Parija SC. Detection of specific cysticercus antigen in the urine for diagnosis of neurocysticercosis. *Acta Trop*. 2004 NovDec;92(3):253-60.

Parolo C, and Merkoci A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. *Chem Soc Rev*. 2013; 42:450-457) (De la Escosura-Muniz A, Parolo C and Merkoci A. Immunosensing using nanoparticles. *Materials Today*. 2010; 13:17-27.

Peeling RW, Holmes KK, Mabey D, Roland A. Rapid tests for STIs: the way forward. *Sex Transm Infect*. 2006; 82, v1-v6.

Proaño-Narvaez JV, Meza-Lucas A, Mata-Ruiz O, Garcia-Jeronimo RC, Correa D. Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis double-blind comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:2115-8.

Quesada-Gonzalez D, Merkoci A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosens Bioelectron*. 2015; 73:47-63.

Quitadamo IJ, Schelling ME. Efficient purification of mouse anti-FGF receptor IgM monoclonal antibody by magnetic beads. *Hybridoma*. 1998;17(2):199–207.

Rodríguez-Hidalgo R, Carpio A, Van den Enden E, Benítez-Ortiz W. Monitoring treatment of *Taenia solium* neurocysticercosis by detection of circulating antigens: a case report. *BMC Neurol*. 2019 Apr 3;19(1):52.

Rodriguez S, Dorny P, Tsang VC, et al. Detection of *Taenia solium* antigens and anti-T. *solium* antibodies in paired serum and cerebrospinal fluid samples from patients with intraparenchymal or extraparenchymal neurocysticercosis. *J Infect Dis* 2009; 199: 1345–52.

Rodriguez S, Wilkins P, Dorny P. Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. *Pathog Glob Health*. 2012; 106:289-98.

Saber R, Sarkar S, Gill P, Nazari B, Faridani F. High resolution imaging of IgG and IgM molecules by scanning tunneling microscopy in air condition. *Scientia Iranica*. 2011 Dec 18;6:1643-1646.

Siddiqui MZ. Monoclonal antibodies as Diagnostics; and Appraisal. *Indian J Pharm Sci*. 2010; 72:12.

Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Sc* 1951;11:55-75.

Walker ID. Detection, Purification, and Utilization of Murine Monoclonal IgM Antibodies. In: *Monoclonal Antibody Protocols* [Internet]. Humana Press; 1995 [cited 2018 Jun 2]. p. 183–8.

Zamora H, Castillo Y, Garcia HH, et al. Drop in antigen levels following successful treatment of subarachnoid neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73: s41.

Zea-Vera A, Cordova EG, Rodriguez S, Gonzales I, Pretell EJ, Castillo Y, et al; Cysticercosis Working Group in Peru. Parasite antigen in serum predict the presence of viable brain parasites in patients with apparently calcified cysticercosis only. *Clin Infect Dis*, 2013 Oct;57(7):e154-9.

Zhang S, Moustafa Y, Huo Q. Different interaction modes of biomolecules with citrate-capped gold nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014 Dec 10;6(23):21184-92.